

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

UNIDAD DE POST GRADO

**Desarrollo de un kit liofilizado de anti-CEA para ser
marcado con tecnecio 99m, obtenido por extracción
con mec, complementado con estudios de estabilidad**

TESIS

para obtener el grado académico de Magíster en Bioquímica

AUTORA

Anita Elizabeth Robles Ñique

ASESORA

Raquel Oré Sifuentes

Lima – Perú

2006

ASESORA

Mg. Raquel Oré Sifuentes

JURADO EXAMINADOR

PRESIDENTA: Mg. Doris Huerta Canales

MIEMBROS: Mg. Mercedes Soberón Lozano

Mg. Nancy Rojas Morán

Mg. Raquel Oré Sifuentes

***Dios es nuestro refugio y nuestra fuerza,
su presencia garantiza el triunfo.***

Salmo 45 (vv. 1-4)

DEDICATORIA

A mis amados hijos, Alfredo y Rocío, quienes me apoyaron en iniciar y terminar mis estudios, sacrificando nuestras horas familiares.

A mis lindos y amorosos padres, Amelia y Baltazar que colaboraron conmigo en concretar este deseo profesional y en especial por abrigar las horas ausentes en mi hogar

A mi querido esposo, Alfonso, le agradezco su compañía y tolerancia que me ha demostrado durante este periodo de arduo trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A mi Asesora, Mg. Raquel Oré Sifuentes, profesora e investigadora de la Unidad de Postgrado de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por su asesoría, calidad profesional y humana brindada a mi persona; asimismo, quiero mencionar que fue la mano amiga que encontré cuando solo tenía el deseo de estudiar una maestría en bioquímica, la misma que me ayudó a alcanzar.

Un agradecimiento especial a la Dra. Mercedes Soberón Lozano, profesora e investigadora de la Unidad de Postgrado de la Facultad de Medicina de la UNMSM, quien ha tenido la paciencia para leer y revisar la presente tesis y hacer algunas sugerencias que se encuentran plasmadas en el presente trabajo.

A mis compañeros y amigos, Guilmer Agurto, Ingrid Petzoldt, Bertha Ramos, Mario Morote y José Caballero, de la Planta de Producción de Radioisótopos del Instituto Peruano de Energía Nuclear que contribuyeron a la realización del presente trabajo.

Al Dr. Francisco Sayas, Instituto de Nefrología de La Habana – Cuba, por su ayuda académica y por compartir su experiencia sobre marcación de biomoléculas con radionucleidos.

Al Ing. Manuel Castro y al Dr. Conrado Seminario, por el apoyo brindado durante la realización del presente trabajo en la Planta de Producción de Radioisótopos del Centro Nuclear “RACSO” del Instituto Peruano de Energía Nuclear.

A mis compañeros de la Maestría en Bioquímica de la Unidad de Postgrado de la Facultad de Medicina (2001 – 2002), de la UNMSM, por haberme permitido conocerlos y seguir disfrutando de su agradable compañía.

A mis profesoras, de la Unidad de Postgrado de la Facultad de Medicina de la UNMSM, por la ayuda académica y el apoyo brindado durante mi permanencia en las aulas.

A las autoridades del Instituto Peruano de Energía Nuclear por facilitarme sus instalaciones, laboratorios, equipamiento y suministros de materiales y radioisótopos.

Al Organismo Internacional de Energía Atómica por el apoyo brindado, a través del proyecto regional ARCAL LII, suministrando materiales, accesorios para equipos y reactivos biológicos, donados al país.

ÍNDICE

	Páginas
RESUMEN	
ABSTRACT	
I INTRODUCCIÓN	1
II MATERIALES Y MÉTODOS	13
1. MATERIALES	13
1.1 Reactivos	13
1.2 Materiales biológicos	13
1.3 Materiales	14
1.4 Equipos	14
2. MÉTODOS	14
2.1 Diseño experimental para desarrollar un kit liofilizado de Anti-CEA, para ser marcado con Tc 99m (MEC)	
2.1.1 Reducción y Purificación del anticuerpo, Anti-CEA	15
2.1.2 Formulación y Liofilización del kit Anti-CEA	16
2.2 Síntesis del Radioinmunoconjugado, ^{99m} Tc-Anti-CEA	17
2.3 Determinación de Condiciones Extremas de Marcación con Tc 99m	17
2.4 Evaluación del Radioinmunoconjugado, ^{99m} Tc-Anti-CEA	18
2.4.1 Pureza Radioquímica	18
2.4.1.1 Cromatografía Instantánea en Capa Delgada (ITLC-SG)	18
2.4.1.2 Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)	20
2.4.2 pH de Marcación	21
2.4.3 Distribución Biológica en Animales de Experimentación	21
2.4.4 Inmunoreactividad	22
2.4.5 Estabilidad <i>in vitro</i> : Desafío contra L- cisteína	23

2.5	Estudios de Estabilidad	23
2.5.1	Estabilidad del Kit Liofilizado de Anti-CEA	24
2.5.2	Estabilidad del Radioinmunoconjugado, ^{99m}Tc -Anti-CEA	24
III	RESULTADOS	25
IV	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	36
V	CONCLUSIONES	45
VI	RECOMENDACIONES	47
VII	ANEXOS	
1	Flujograma del Desarrollo de un Kit Liofilizado de Anti-CEA, para ser marcado con Tc 99m	48
2	Curva de elución: Purificación del Anti-CEA reducido	51
3	Esquema del Ciclo de Liofilización para el Anti-CEA	52
4	Mecanismo de Reacción Propuesto	53
5	Marcación del Anti-CEA por el Método Directo con Tc 99m	55
6	Pureza Radioquímica del ^{99m}Tc -Anti-CEA, por ITLC-SG	56
7	Pureza Radioquímica del ^{99m}Tc -Anti-CEA, por HPLC (< 90%)	57
8	Pureza Radioquímica del ^{99m}Tc -Anti-CEA, por HPLC (> 90%)	58
9	Radioinmunocromatograma del ^{99m}Tc -Anti-CEA, por CACF	59
10	Distribución Biológica del ^{99m}Tc -Anti-CEA (Hoja de Cálculo)	60
11	Proceso de Producción del Tc 99m, por extracción con MEC	61
12	Hoja Técnica del Pertecnetato de Sodio Tc 99m	62
13	Características del Anticuerpo Monoclonal, Anti-CEA	63
14	Fotos de los Laboratorios, Materiales, Equipos Utilizados	66
15	Glosario	75
VIII	BIBLIOGRAFÍA	78

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Tc 99m	: Tecnecio 99 metaestable (^{99m}Tc)
Tc 99	: Tecnecio 99 estable (^{99}Tc)
TcO ₂	: Dióxido de tecnecio ($^{99m}\text{TcO}_2$)
Na $^{99m}\text{TcO}_4$: Solución de Pertecnetato de sodio Tc 99m
$^{99m}\text{TcO}_4^-$: Ion pertecneciato
I 131	: Iodo 131
In 111	: Indio 111
Mo 99	: Molibdeno 99
AcMo	: Anticuerpo Monoclonal
CEA	: Adenoma carcinoma embrionario
Anti-CEA	: Anticuerpo contra el Adenoma carcinoma embrionario
2-ME	: 2 Mercaptoetanol
MEC	: Metiletilcetona
mCi	: Unidad de radiactividad, milicurie
PRQ	: Pureza Radioquímica
Ac	: Anticuerpo
Ag	: Antígeno
T $\frac{1}{2}$: Periodo de semidesintegración
MDP	: Acido metilén difosfónico
MDP-Sn	: Metilén difosfonato – estaño
ITLC-SG	: Cromatografía instantánea en capa delgada - silica gel
SnF ₂	: Fluoruro estañoso anhidro
HPLC	: Cromatografía líquida de alta eficiencia
%FI	: Porcentaje de fracción inmunoreactiva
R _f	: Relación de Frente, parámetro cromatográfico
Cys	: L- cisteína
keV	: kilo electrón voltio
kD	: kilo Dalton
ARCAL	: Acuerdo Regional de Cooperación para la Promoción de la Ciencia y la Tecnología Nucleares en América Latina y el Caribe.

RESUMEN

El cáncer colorectal ocupa el sexto lugar en el Perú, más de 350 personas son diagnosticadas anualmente con esta enfermedad, ante tal incidencia, el presente trabajo contribuye con el desarrollo de un kit liofilizado de anticuerpo monoclonal Anti-CEA para ser marcado con el radionucleido Tc 99m, para el diagnóstico precoz de tumores adenocarcinoma embrionario. Ante la falta de un generador de adsorción de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ en el país, se utiliza el Tc 99m proveniente de un generador de extracción, que emplea la metiletilcetona (MEC) como solvente. **Primero**, se han diseñado sistemáticamente 4 formulaciones liofilizadas y mediante la determinación de la pureza radioquímica del $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Anti-CEA, se han evaluado el efecto de la relación molar del AcMo: 2-ME (1:1000 y 1:2000), el incremento del agente reductor (3,50 a 5,95 μg SnF_2) y de la proteína reducida (1,0 a 1,2 mg Anti-CEA). **Segundo**, Sobre la base de la evaluación de los resultados de estas 4 formulaciones liofilizadas, se han preparado 4 lotes experimentales. La metodología desarrollada se inicia con la reducción de la proteína por el método directo con 2-ME, la purificación en columna de PD10, luego la adición del SnF_2 y MDP, y finalmente la liofilización. El kit liofilizado es marcado con Tc 99m por el método directo para obtener el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Anti-CEA y se determina la pureza radioquímica por cromatografía en ITLC-SG y HPLC, soporte de actividad y volumen de Tc 99m, distribución biológica en ratones sanos, inmunoreactividad determinada por cromatografía de afinidad y el desafío con L-cisteína determinada por cromatografía en ITLC-SG. Se complementa con estudios de estabilidad en tiempo real tanto para el kit liofilizado como para el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Anti-CEA. Los resultados de la **primera parte**, la 1º; 2º; 3º y 4º formulación liofilizada tuvieron una pureza radioquímica del 71, 92, 94 y 97% respectivamente, a un pH de marcación entre 7,0 a 7,5. Los resultados de la **segunda parte**, los 4 lotes experimentales tuvieron en promedio una pureza radioquímica mayor del 95%, soporta 50 mCi de Tc 99m en un volumen máximo de 5 mL. El porcentaje de fracción inmunoreactiva es del 78,32% (Ac-Ag). El porcentaje de transquelación o disociación frente a la L-cisteína es 5,56% para una relación molar AcMo: Cys 1:100 y 7,05% para 1:1000, después de 4 horas de incubación a 37°C; a las 24 horas es 10,45% para 1:100 y 15,75% para 1:1000. La distribución biológica en ratones sanos sacrificados a las 4 horas, evidencia un porcentaje de dosis de inyección en sangre 55,98%, hígado 14,90%; riñones 3,8%; intestinos 18,07%; en estomago y tiroides es menor del 1%. Estos lotes experimentales del kit liofilizado presentan una estabilidad de 13 meses con una pureza radioquímica mayor del 93%; y el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Anti-CEA tiene una estabilidad de 4 horas, post-marcación, con una pureza radioquímica mayor del 90%. Estos resultados demuestran que se ha logrado desarrollar un kit liofilizado estable de Anti-CEA para ser marcado con Tc 99m (MEC), obteniéndose el $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Anti-CEA con una alta pureza radioquímica mayor del 97%, valores aceptables y comparables con los reportados con Tc 99m, proveniente de un generador de adsorción. Los ensayos de inmunoreactividad, desafío con L-cisteína, distribución biológica y estudio de estabilidad han demostrado la alta calidad de este kit liofilizado que mantiene la capacidad de reconocimiento biológico frente a su antígeno CEA.

Palabras Claves: Tc 99m-generador de extracción; kit liofilizado; Anti-CEA

ABSTRACT

The colorectal cancer places the sixth place in Peru, more than 350 persons are diagnosed annually with this illness, for that reason, the present work contributes with the development of a lyophilized kit of monoclonal antibody Anti-CEA to be labelled by the radionuclide Tc 99m, for the early diagnosis of tumours embryonic adenocarcinoma. For the lack of a generator of adsorption of ^{99}Mo / $^{99\text{m}}\text{Tc}$ in the country, the Tc 99m is used instead of this, coming from a generator of extraction, that use the methylethylketone (MEK) like solvent. **First**, it was designed systematically 4 lyophilized formulations and through the determination of the radiochemical purity of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Anti-CEA, the effect of the molar relation has been evaluated of the MoAb: 2-ME (1:1000 and 1:2000), the increasing of the reductor agent (3,50 to 5,95 μg SnF_2) and the reduced protein (1,0 to 1,2 mg Anti-CEA). **Second**. On the base of the evaluation of the results of these 4 lyophilized formulations, 4 experimental lots have been prepared. The developed methodology initiates with the reduction of the protein for the direct method with 2-ME, the purification in column of PD10, then the addition of the SnF_2 and MDP, finally the lyophilization. Lyophilized kit is labeled by Tc 99m by the direct method to obtain $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Anti-CEA and the radiochemical purity is determined by chromatography in ITLC-SG and HPLC, activity support and volume of Tc 99m, biological distribution in healthy mice, immunoreactivity is determined by chromatography of affinity, challenge with L-cisteína determined by chromatography in ITLC-SG. It complements itself with studies of stability in real-time for the lyophilized kit and for $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Anti-CEA. **The results of the first part**, its 1st; 2nd; 3rd and 4th lyophilized formulation had a radiochemical purity of 71, 92, 94 and 97 % respectively, to a pH of labelled between 7,0 to 7,5. **The results of the second part**, 4 experimental lots had in average of radiochemical purity more than 95 %, it supports 50 mCi of Tc 99m in a maximum volume of 5 mL. The percentage of fraction immunoreactive is 78,32 % (Ab-Ag). The percentage of transchelation or dissociation face to the L-cisteína is a 5,56 % for a molar relation MoAb: Cys 1:100 and 7,05 % for 1:1000, after 4 hours of incubation to 37°C. After 24 hours it is a 10, 45 % for 1:100 and 15, 75 % for 1:1000. The biological distribution in healthy mice sacrificed after four hours, demonstrates a percentage of dose of injection in blood 55,98 %, liver 14,90 %; kidneys 3,8 %; intestines 18,07 %; in stomach and thyroid gland he is a minor of 1 %. These experimental lots of lyophilized kit present a stability of 13 months with radiochemical purity more than 93 %; and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Anti-CEA it has a stability of up to 4 hours, post-labelling, with radiochemical purity more than 90 %. With these results, shows us that we have developed to a stable lyophilized kit of Anti-CEA to be labelled by Tc 99m (MEK), obtaining $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Anti-CEA with a high radiochemical purity more than 97 %, values acceptable and comparable with the published reports with Tc 99m, coming from a generator of adsorption. The immunoreactivity test, challenging with L-cysteine, biological distribution and study of stability have demonstrated the high quality of this lyophilized kit that keeps the capacity of biological recognition face its antigen CEA.

Keywords: Extraction $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -generator; lyophilized kit; Anti-CEA

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer es uno de los problemas más importante a escala mundial, que viene creciendo sobre todo en los países en desarrollo, mientras que en los países desarrollados dicha tasa de incidencia ha ido disminuyendo en las últimas décadas, debido a que cuentan con los recursos económicos y nuevas tecnologías que permiten la detección precoz y mejoras en el tratamiento terapéutico de ciertas enfermedades oncológicas, tales como cáncer de mama, colorectal, ovárico y próstata.

En Latinoamérica el cáncer ocupa el tercer lugar de las causas de muerte y en el Perú, el Registro de Cáncer de Lima Metropolitana, ha publicado tasas de incidencia y mortalidad por cáncer global de 150,7 y 78,3 por cien mil habitantes de nuestra ciudad capital, respectivamente.

El cáncer colorectal es el segundo tumor más común en el mundo occidental y aun se encuentra en ascenso ¹. En Lima Metropolitana, ocupa el sexto lugar y su incidencia es de 6 casos por 100 mil habitantes al año, es decir, más de 350 personas son diagnosticadas anualmente con esta enfermedad. El adenocarcinoma colorectal es uno de los tumores malignos más comunes en hombres y mujeres que son detectados tardíamente, es importante que esta enfermedad sea diagnosticada tempranamente para dar un tratamiento oportuno y la inmunocentelleografía es una alternativa para obtener imágenes tempranas de la enfermedad.

Inmunocentelleografía

El uso de anticuerpos para la detección y tratamiento del cáncer fue iniciado hace más de 100 años. En 1885, Hericourt y Richet prepararon un antisuero dirigido contra el sarcoma osteogénico y luego trataron 50 pacientes con resultados clínicos, los cuales fueron luego considerados positivos ². Presuman, en 1953, fue capaz de visualizar un sarcoma osteogénico transplantado dentro de un animal experimental utilizando anticuerpos marcados con Iodo 131 ³.

Después de la identificación del CEA (antígeno carcinoembrionario) por Gold y Freeman en pacientes con cáncer colorectal, en 1965; Goldenberg, en 1972, utilizando una técnica que designó como radioinmunodetección ⁴ empleando anticuerpos Anti-CEA marcados con Iodo 131 en tumores heterotransplantado, logró visualizar estos tumores. En 1975, Kohler y Milstein introducen la técnica del hibridoma, por medio del cual los anticuerpos monoclonales son producidos a través de la fusión de linfocitos inmunizados de un animal experimental y células de mieloma humano ⁵. Esto fue la base, para que Mach y col., en 1981, realizaran el primer estudio en pacientes humanos con cáncer colorectal utilizando el anticuerpo monoclonal Anti-CEA marcado con Iodo 131 ⁶.

Las imágenes obtenidas en medicina nuclear, utilizando anticuerpos monoclonales (AcMos) marcados con un radionucleido o radiomarcados, fueron designadas como inmunocentelleográficas o radioinmunocentelleográficas. Estas imágenes constituyen una modalidad de diagnóstico especial, desde que están basadas en una propiedad biológica de la célula tumoral. Asimismo, facilitan la detección de antígenos expresados por las células tumorales por medio de la administración de anticuerpos producidos especialmente contra esos antígenos. La selección del anticuerpo, del radionucleido, de la técnica de imagen y la experiencia del observador, son factores decisivos para alcanzar buenos resultados. El protocolo de imagen es variable dependiendo del tipo de anticuerpo y del radionucleido utilizado para la marcación. La biodistribución del agente radiofarmacéutico influye sobre el tiempo en el cual la imagen es realizada. La forma de administración es por inyección intravenosa lenta. Además, pueden realizarse vistas de todo el cuerpo, estudios tomográficos (SPECT) de áreas anatómicas clínicamente sospechosa o reconocimiento morfológicos.

Esta metodología ha sido extensamente utilizada en pacientes con cáncer colorectal, entre otros tumores. En los últimos años, un esfuerzo extensivo ha sido realizado para mejorar el diagnóstico y terapia de tumores sólidos. Sin embargo, la mayor parte de tumores continúan constituyendo un serio problema médico, como se ha evidenciado en el tiempo corto de sobrevivencia de pacientes con este tipo de tumor ^{1,7}.

La inmunocentelleografía, con un rango de sensibilidad entre 89 a 95%, se ha revelado por si misma como un método prometedor en el seguimiento post-cirugía de pacientes con cáncer colorectal, cuando hay evidencia clínica y/o de laboratorio que indican la recurrencia o metástasis tumoral, especialmente cuando otras modalidades de imágenes, denominadas técnicas radiológicas, no son capaces de confirmar estas situaciones ⁸.

La variedad de anticuerpos monoclonales con aplicaciones de diagnóstico se ha incrementado continuamente y muchos otros tipos de tumores han sido estudiados. El valor de este método eventualmente dependería de muchos factores, entre los cuales están el tamaño del tumor, su vascularización, el grado de necrosis, la cantidad de antígeno presente en la superficie de estas células, y la presencia o ausencia de anticuerpos circulante y su reactividad.

Anticuerpos monoclonales

La producción de anticuerpos monoclonales ha constituido una revolución dentro del desarrollo tecnológico del mundo científico actual y la alta especificidad de éstos los han convertido en una herramienta fundamental en todos los campos de la biomedicina y la inmunología actual; aunque debemos señalar que es quizás en el campo de la oncología, donde el desarrollo de los anticuerpos monoclonales ha sido y es más relevante ¹⁰.

Además de su alta especificidad, poseen dos propiedades que han contribuido a su éxito:

1. Son sustancias químicamente bien definidas, su naturaleza y estructura se conocen en detalle lo cual permite la formulación de preparaciones estables y facilita grandemente los procedimientos para su conjugación a trazadores tales como: sustancias fluorescentes, enzimas o radionucleidos.
2. Son reactivos susceptibles de ser preparados en forma pura, en condiciones muy controladas y en grandes cantidades.

Basándose en la alta especificidad del anticuerpo por su antígeno, estos han sido ampliamente estudiados como los vehículos transportadores de radionucleidos con características diagnósticas o terapéuticas hacia el órgano blanco. La relación de los radionucleidos para la inmunocentelleografía se orienta en principio en los mismos criterios que también rigen para los otros estudios de medicina nuclear, como son el periodo de semidesintegración corto y la radiación gamma de baja energía (100 – 300 keV).

Además debemos añadir que el radionucleido correspondiente debe tener una fuerte unión con el anticuerpo y no debe provocar cambios esenciales en su estructura, que provoque la pérdida de su actividad biológica. Ver Tabla 1.

Tabla 1. Radionucleidos más utilizados en inmunocentelleografía

Radionucleido	T _{1/2}	Método decaimiento	Energía (keV) y abundancia (%)
Tc 99m	6,02 h	IT	γ 140 (89%)
I 123	13,2 h	ε	γ 159 (83%)
In 111	67,9 h	ε	γ 171 (91%), 245 (94%)
I 131	8,04 d	β ⁻	β ⁻ 612 máx. (87%) γ 284 (6%), 364 (81%), 637(7.3%)

El Anti-CEA (anticuerpo monoclonal contra el Antígeno Carcinoembrionario, CEA) ha sido marcado eficientemente con los radionucleidos ¹¹¹In, ¹³¹I, ¹²³I y ^{99m}Tc, convirtiéndose en un radiofármaco que ha demostrado tener un gran potencial para obtener imágenes “*in vivo*” de tumores colorectales, definiendo mejor la extensión del tumor que la tomografía axial computarizada e influyendo en las decisiones quirúrgicas.

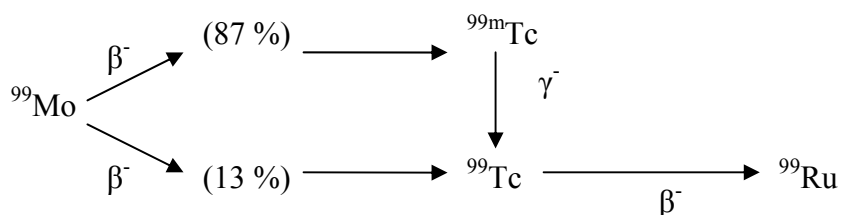
El **I 131** fue uno de los primeros radionucleidos utilizados para la marcación de proteína, la desventaja que presenta es su alta dosis de irradiación debido principalmente a su desintegración beta.

El **I 123** resulta ser más apropiado para la inmunocentelleografía debido a sus mejores características físicas, pero su desventaja es su alto costo de producción ^{10,11}.

El **In 111** es un radionucleido excelente porque su $T_{1/2}$ garantiza que se establezca el equilibrio “*in vivo*” necesario para obtener una alta relación blanco/fondo. Sin embargo, es moderadamente caro y su principal inconveniente es su elevada captación en hígado, bazo y médula ósea, además de ser un producto del ciclotrón ^{10,11}.

El **Tc 99m**, por sus características nucleares, resulta ser el radionucleido ideal para muchas aplicaciones en medicina nuclear. Su energía gamma de 140 keV permite la obtención de imágenes gammagráficas de gran calidad. Al ser un emisor gamma puro y tener un periodo de semidesintegración de 6 horas, la dosis de radiación recibida es de baja energía, lo cual pudiera permitir la administración de mayores cantidades de radiación, sin que haya daños para el paciente. Otras ventajas que presenta son su fácil disponibilidad y bajo costo frente a los otros radionucleidos mencionados; este radionucleido es obtenido habitualmente de un generador de adsorción $\text{Mo}^{99}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ ^{12,13}.

Tecnecio 99m, Tc 99m, se obtiene a partir del molibdeno 99 que al desintegrarse espontáneamente, por emisión de radiaciones beta negativa (β^-), origina los dos isómeros nucleares de tecnecio 99.



La relación entre los dos radionucleidos, padre e hijo ha determinado el desarrollo de los llamados “generadores”. En un generador coexisten los dos elementos químicos y el tecnecio o elemento hijo se puede separar del molibdeno – padre a medida que se va produciendo o bien a intervalos establecidos. La separación se hace posible debido a importantes diferencias fisicoquímicas como son: El coeficiente de adsorción de las sales y el coeficiente de distribución o extracción en disolventes orgánicos. De acuerdo a estas propiedades fisicoquímicas, los métodos más usuales para separar el tecnecio de su progenitor son por adsorción (generadores de adsorción) y por extracción. Se debe mencionar que el molibdeno 99, se puede obtener por irradiación con neutrones ^{98}Mo (n,γ) ^{99}Mo y por fisión del uranio ^{235}U (n,f) productos de fisión.

El generador de adsorción, $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, consta fundamentalmente de una columna de vidrio conteniendo alúmina, con el molibdeno adsorbido, y de un sistema de elución. La columna es esterilizada y colocada dentro de un blindaje de plomo, para finalmente ser eluido con cloruro de sodio 0,9%. El eluato, con el tecnecio 99m, puede estar contaminado con ciertos elementos químicos. Así, la pureza química implica que el eluato esté libre, principalmente de aluminio y de molibdeno 99. El catión Al^{3+} proveniente de la columna de alúmina altera los resultados en la preparación de los radiofármacos. También el molibdeno estable arrastrado, modifica la naturaleza química de las formulaciones inyectables. Otros contaminantes químicos presentes pueden ser iones sulfato, clorato, perclorato y nitrato, utilizados para evitar que el tecnecio 99m de valencia VII se reduzca a V o IV ⁹.

Las ventajas principales del generador de adsorción son: el procedimiento de manufactura es sencillo, no implica grandes problemas en cuanto a exposición a la radiación y es portátil, es sencillo de manejar y eluir. La desventaja es el alto costo de la materia prima que es el molibdeno irradiado con neutrones o producido por fisión.

El generador de extracción, la separación del tecnecio y del molibdeno es por extracción en un disolvente orgánico. El tecnecio en solución acuosa puede ser extraído con alcoholes, cetonas, éteres, entre otros. En el caso de las cetonas, la mejor es la 2-butanona, conocida metiletilcetona o como MEC.

El MEC es soluble en agua pero por efecto de las concentraciones de sales se separa de soluciones fuertemente alcalinas. Al permitir la separación de las dos fases, la orgánica superior contiene al tecnecio y en la fase acuosa alcalina permanece el molibdeno. La mezcla de pertecnetato – MEC, se purifica, a través de columna de alúmina para eliminar residuos de molibdeno que pudieran haber sido arrastrados en la separación de las fases. Se evapora el disolvente orgánico y el residuo con el pertecnetato se resuspende en un volumen deseado de solución alcalina ³⁴. El paso final es el tratamiento farmacológico para que pueda ser utilizado como inyectable.

Las ventajas principales de un generador de extracción son: utiliza molibdeno de irradiación, de baja actividad específica que es más fácil y barato de producir que el de fisión; la contaminación con Mo 99 es menor del 0,05% y la pureza radioquímica es superior al 98%; y no contiene agentes oxidantes. La desventaja es que no es portátil y sólo puede ser utilizado localmente.

La experiencia mundial muestra que el tecnecio 99m obtenido por extracción no siempre muestra resultados satisfactorios, en la marcación de biomoléculas, por la presencia del Tecnecio 99 estable que compite con el Tecnecio 99 metaestable; la mayoría de anticuerpos monoclonales investigados han sido marcados con Tc 99m proveniente de un generador de adsorción, ⁹⁹Mo/^{99m}Tc, y no se han reportado formulaciones liofilizadas para ser marcadas con Tc 99m resultante de la extracción con MEC ^{22,23}.

En el Perú, el Instituto Peruano de Energía Nuclear (IPEN), viene produciendo Tc 99m desde inicios de los años noventa, la producción se realiza por medio de la tecnología de extracción con MEC, la fabricación es sencilla y se obtiene una solución en la forma química de pertecnetato de sodio Tc 99m ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$); con una excelente pureza química ($< 5 \text{ ppm Al}^{+3}$, $< 0.1\%$ MEC), alta pureza radioquímica ($> 98\%$ como Tc 99m) y radionucleídica ($> 99,95\%$ como Tc 99m), y exenta de agentes oxidantes.

Marcación de anticuerpos monoclonales con radionucleidos

El método para marcar un anticuerpo monoclonal con un radionucleido determinado, depende del radionucleido, de su metabolismo en el tejido y de la accesibilidad a los grupos funcionales del anticuerpo para su conjugación. Los métodos más conocidos se han clasificado como **Métodos Directos**, en los cuales el radionucleido es unido directamente a grupos endógenos de la cadena lateral de la proteína y **Métodos Indirectos**, en los cuales grupos prostéticos bifuncionales exógenos son unidos, por una parte, a los grupos funcionales de las cadenas laterales de la proteína y por la otra al radionucleido.

Hnatowich ¹⁵ ha realizado una comparación entre los métodos de marcación indirectos y directos con Tc 99m, llegando a la conclusión de que la vía directa muestra una mayor inestabilidad, conduciendo a la transquelación relativa, tanto “*in vitro*” como “*in vivo*”. Sin embargo, los métodos directos han sido evaluados con muy buenos resultados y se han desarrollado formulaciones como el anti-CEABW431/26 ^{16,17} y el iorCEA-1 ¹⁸, el SM3 para cáncer de ovario entre otros. Los métodos directos se caracterizan por ser una técnica sencilla y de fácil adaptación para desarrollar nuevos procedimientos de marcación de AcMos con radionucleidos, por lo que son actualmente preferidos por algunos investigadores ^{19,20}.

Características de la técnica de marcación a emplear ¹⁴:

- Debe ser rápida y fácil de realizar.
- La eficiencia de marcación debe ser alta al igual que la actividad específica.
- El anticuerpo debe preservar sus propiedades biológicas e inmunológicas
- La unión entre el anticuerpo y el radionucleido debe ser suficientemente fuerte.
- Los reactivos utilizados para la marcación deben ser estables, de fácil adquisición y no tóxicos.

El **Método Directo** utilizado para la marcación del anticuerpo monoclonal es una técnica desarrollada por Schwarz y Cols.¹⁶, en 1987. El anticuerpo monoclonal nativo es tratado con 2-mercaptoetanol (2-ME) para reducir los puentes disulfuro de la proteína y convertirlos en grupos tioles libres, los cuales, en presencia de un ligante débil, se unen al Tc 99m formando enlaces ^{99m}Tc-S-. Dado que la introducción del ^{99m}Tc a la proteína es un proceso con una cinética lenta, y para evitar la hidrólisis y oxidación del ^{99m}Tc, se utiliza un ligante débil como los fosfonatos y tartratos, que estabilizan al ^{99m}Tc y facilitan la cinética de marcado de la proteína a través de un intercambio de ligantes^{21,23}

En 1990 Mather y Ellison²¹, reportaron un estudio sobre la marcación de AcMo por el método directo utilizando una mezcla de metilén difosfonato-estaño (MDP-Sn) obtenida de un juego de reactivo comercial donde el MDP actúa como ligante débil competitivo y el estaño como agente reductor. A partir de esta fecha se han reportado otros trabajos utilizando fosfonatos, gluconato, tartratos, gentisato, glucarato, como ligantes adecuados.

En 1994 Ferro-Flores y Lezama²⁶, obtuvieron una formulación liofilizada para la preparación instantánea del conjugado AcMo-ior-CEA-^{99m}Tc utilizando como ligante débil el etilén-hidroxi-difosfonato (EDHP) y un anticuerpo monoclonal anti-CEA producido por el Centro de Inmunología Molecular de La Habana, Cuba. Las pruebas “*in vitro*” demostraron alta pureza radioquímica (> 95%) y estabilidad del conjugado de por lo menos 24 horas, mientras que con las pruebas “*in vivo*” se ha establecido que el anticuerpo marcado mantuvo un alto reconocimiento hacia el tumor colorectal.

En 1999 Castro y Ramírez ³⁷, desarrollaron formulaciones en solución de anticuerpos monoclonales, IOR cea-1 e IOR egf/r3, para ser marcados con Tc 99m; utilizaron como agente ligante un kit comercial de AMD, que contenía ácido metilendifosfónico, cloruro de estaño y ácido ascórbico, la formulación obtenida fue almacenada en nitrógeno líquido (-50°C) y alcanzaron una estabilidad de 10 días en solución, con una pureza radioquímica mayor del 90% al ser marcado con Tc 99m, obtenido por MEC.

En 2001, Petzoldt ^{41,42}, determinó los parámetros de temperatura que controlan los procesos de liofilización, en base a los puntos eutécticos, y estableció un programa de liofilización para formulaciones basadas en proteínas, como inmunoglobulina gamma (IgG) y macroagregados de albúmina humana (MAA); y utilizó nitrógeno líquido para acortar el tiempo de duración del ciclo de liofilización; obteniendo un porcentaje de humedad entre 0,15 al 5%, dependiendo de la composición de cada formulación. Posteriormente, publicó un ciclo de liofilización para el MAA de 26 horas, alcanzando gradualmente una temperatura de secado de 25 °C; y reportó un porcentaje de humedad menor del 3%, evidenciando una estabilidad mayor de un año.

En 2002 Ferro-Flores y Cols., ARCAL LII-OIEA²³, elaboraron un protocolo modelo para la preparación y control de calidad de radiofármacos para inmunocentelleografía basados en anticuerpos monoclonales; para ser marcados por el método directo con Tc 99m, radionucleido proveniente de un generador de adsorción; indicaron que no se han evidenciado marcaciones con Tc 99m, extraído con MEC. Asimismo, proponen un ciclo de liofilización de 27 horas y recomiendan aumentar el tiempo de secado secundario hasta obtener niveles del 2% de humedad residual en el producto seco; reportaron una estabilidad de 3 meses para la formulación liofilizada.

Basándose en todo lo expuesto, las principales dificultades encontradas en el desarrollo de radiofármacos, basados en anticuerpos monoclonales, están asociadas al método de reducción y purificación de la proteína, a la composición cuali-cuantitativa, al proceso de liofilización, al método de marcación con el radionucleido, y finalmente a la estabilidad del kit liofilizado, que debe mantener inalterables las propiedades físicas, químicas y biológicas de la proteína; conservando sus propiedades inmunoreactivas después de ser marcado con un radionucleido.

A continuación se da a conocer la justificación, los objetivos generales y específicos, planteados al inicio de este trabajo; así como, el impacto social que se espera lograr con esta investigación básica.

Justificación

Las aplicaciones clínicas que involucran el uso de radiofármacos basados en anticuerpos monoclonales, no son de uso rutinario en nuestro país, debido al elevado costo que implica la importación de estos productos. Existe la necesidad de la comunidad médica por contar con estos radiofármacos llamados de “Tercera Generación”, ya que constituyen una herramienta eficaz en el diagnóstico y tratamiento de neoplasias malignas. Uno de ellos es el Anti-CEA marcado con Tc 99m, que permitirá obtener imágenes “*in vivo*” de tumores de adenocarcinoma embrionario, definiendo mejor la extensión del tumor que la tomografía axial computarizada e influyendo en las decisiones quirúrgicas.

Asimismo, el país no produce generadores de adsorción, $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$, importarlo implicaría un costo alto que no permitiría ser accesible a toda la población; pero si produce generadores de extracción con metiletilcetona. Por lo que se justifica utilizar Tc 99m, extraído con MEC, para demostrar que la pureza radioquímica del $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Anti-CEA es igual o mayor a los obtenidos con el Tc 99m proveniente de generadores de adsorción.

El Objetivo General del presente trabajo, es desarrollar una formulación liofilizada estable de Anti-CEA para ser marcada con Tc 99m, radionucleido obtenido por extracción con metiletilcetona (MEC), para su uso potencial en el diagnóstico precoz y control de recidivas de cáncer colorectal.

Los Objetivos Específicos son:

- Obtener una proteína reducida y purificada.
- Obtener un kit (juego de reactivo) liofilizado de Anti-CEA estable.
- Marcar por el método directo el kit liofilizado con Tc 99m, radionucleido obtenido por extracción con MEC.
- Obtener una pureza radioquímica estable mayor del 90%, como ^{99m}Tc - Anti-CEA.
- Realizar estudios de estabilidad “*in vitro*” e “*in vivo*” del radioinmunoconjugado, ^{99m}Tc - Anti-CEA.
- Estudiar la estabilidad del kit liofilizado en tiempo real almacenado en condiciones apropiadas para una proteína liofilizada.

Impacto Social

El país va a contar con un radiofármaco basado en un anticuerpo monoclonal, Anti-CEA, marcado con Tc 99m, radionucleido nacional producido por el método de extracción con MEC, para ser utilizado potencialmente en el diagnóstico precoz de cáncer colorectal. Los principales beneficiarios son los pacientes diagnosticados precozmente con esta enfermedad, que tendrán un tratamiento temprano, eficaz y una mejor calidad de vida. Además, va a contribuir a disminuir las tasas de incidencias y mortalidad del cáncer en la población peruana. Igualmente, favorecerá el desarrollo de la Medicina Nuclear en el Perú, que viene experimentado actualmente una serie de cambios de acuerdo a las innovaciones tecnológicas a nivel mundial, prueba de ello son los equipos sofisticados como el SPECT (Single photon emission computed tomography), que se vienen adquiriendo últimamente en el Sector Salud; los cuales requieren de los nuevos radiofármacos denominados “tercera generación” como es el Anti-CEA producido en forma liofilizada para ser marcado con Tc 99m.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en los laboratorios de la Planta de Producción de Radioisótopos (PPR) del Centro Nuclear “RACSO” del Instituto Peruano de Energía Nuclear (IPEN). La PPR cuenta con recintos de plomo, campanas radioquímicas, áreas limpias, laboratorios y equipamiento apropiados para el desarrollo de nuevas biomoléculas radiomarcadas.

1. MATERIALES

1.1 REACTIVOS.- Todos los reactivos que se utilizaron en este trabajo fueron de grado analítico y contaron con certificado de análisis. Con tal propósito se usaron: 2-mercaptoetanol, L-cisteína, fluoruro de estaño anhidro, ácido metilén difosfónico, marca SIGMA; cloruro de sodio 0.9%, fosfato de sodio monobásico anhidro, fosfato de sodio dibásico, hidróxido de sodio, metiletilcetona, acetona, etanol, hidróxido de amonio de la marca MERCK; pertecnetato de sodio, Tc 99m (extraído con MEC), este último se ha obtenido del IPEN.

1.2 MATERIALES BIOLÓGICOS.- El anticuerpo monoclonal murino IgG1 designado como Anti-CEA contra el antígeno carcinoembrionario (CEA), ha sido obtenido del Centro de Inmunología Molecular (CIM, La Habana, Cuba) en viales de 5 mL conteniendo una solución estéril y apirógena de buffer de fosfato salino a pH de 7,4 con una concentración de anticuerpo de 5 mg/mL. Antígeno CEA, con una pureza mayor a 95% marca SCRIPPS; seroalbúmina humana, suero fetal bovino de la marca SIGMA y los animales de laboratorio: ratones sanos, raza CFW y con peso entre 20 a 35 g; este último proveniente de la Universidad Nacional Agraria.

1.3 MATERIALES.- Columnas PD-10 marca PHARMACIA; Columna de exclusión molecular para HPLC Protein Pak SW 300 marca WATERS; papel para cromatografía instantánea en capa fina de fibra de vidrio impregnadas con sílica gel (ITLC.SG) marca GELMAN; pipetas automáticas de 5 – 10 μ L, 50 – 100 μ L y 1 mL; tubos eppendorf, 1,5 – 2,0 mL; puntas para las pipetas automáticas; cubetas de cuarzo para 1 mL de 1 cm. de paso óptico; fiola de 1 litro y 25 mL; filtro de membrana 0,22 μ m marca MILLIPORE; jeringa de vidrio para HPLC de 20 μ L; nitrógeno gaseoso grado 5,0 y líquido fabricado por PRAXAIR. Viales de borosilicato incoloro tipo 1 de 7 mL, tapones de clorobutilo y precintos de seguridad de aluminio.

1.4 EQUIPOS.- Balanza analítica marca AND modelo 180; Espectrofotómetro marca HITACHI modelo 2000 UV-VIS; Cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC) con detector UV, marca UNICAM y detector radiométrico de INa (TI) 3"x3" tipo pozo marca CANBERRA; cabina de flujo laminar marca LABCONCO; potenciómetro marca FISCHER, modelo 386; liofilizador marca HETO; refrigerador LG; plancha de calentamiento marca NOVOA II; contador automático gamma marca WIZARD WALLAC modelo 1480 y cadena de espectrometría gamma monocanal marca CANBERRA y un calibrador de dosis marca CAPINTEC modelo CR12. Estufa al vacío marca FISHER

2. MÉTODOS

2.1 Diseño experimental para desarrollar un kit liofilizado de Anti-CEA, para ser marcado con ^{99m}Tc (MEC).

Se desarrollaron cuatro formulaciones, según el método descrito por Mather y Ellison ²¹ y modificada por ARCAL LII ²³, ambos métodos describen formulaciones de anticuerpos monoclonales para ser marcados con Tc 99m, proveniente de un generador de adsorción, por tal motivo fue necesario realizar algunas modificaciones. La primera formulación se desarrolla según la formulación descrita en ARCAL LII, sobre la base de los resultados obtenidos en esta primera formulación se desarrollan la segunda, tercera y cuarta formulación. Se realiza considerando tres variables independientes con diferente nivel de respuesta sobre una variable dependiente. Ver Tabla 2.

Tabla 2. Selección de variables independientes y dependiente, para desarrollar un kit liofilizado de Anti-CEA

Variable Independiente		Variable Dependiente
Relación Molar, AcMo:2-ME	1:1000 y 1:2000	Pureza Radioquímica (^{99m}Tc -Anti-CEA)
Cantidad de Anti-CEA reducida por kit	1 y 1,2 mg	
Fluoruro estañoso por kit	3,5 y 5,95 μg	

La metodología descrita a continuación corresponde a la formulación desarrollada, Formulación N° 4, con la cual se logra obtener un kit liofilizado de Anti-CEA para ser marcado con Tc 99m (MEC). Con esta formulación se prepararon cuatro lotes experimentales: L-01; L-02; L-03 y L-04; que permitieron evaluar su estabilidad *in vitro e in vivo*, así como la estabilidad del kit con el tiempo.

2.1.1 Reducción y purificación del anticuerpo monoclonal, Anti-CEA

El método de reducción y purificación se realiza según el método descrito por Schwarz y Cols.¹⁶, con algunas modificaciones. La reducción del anticuerpo monoclonal (AcMo) se logra con 2-mercaptoetanol (2-ME) a una relación molar de AcMo: 2-ME, 1:2000. Se parte de la solución del Anti-CEA (5 mg/mL), a 2 mL de esta solución se adiciona 2-ME en una relación molar de 1: 2000 (AcMo: 2-ME), es decir para 10 mg de AcMo se utiliza 5 μL de 2-ME. Se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se aplica la solución del Anti-CEA reducido en una columna PD10, previamente lavada con 25 mL de buffer fosfato 0,1M pH 7,2 – 7,4 frío y nitrogenado por 15 minutos. Se eluye con buffer fosfato frío y nitrogenado, y se colecta 12 fracciones de 1 mL en tubos eppendorf, se mantienen cerrados y en frío. De cada fracción se retira 100 μL y se completa a 1000 μL con buffer fosfato 0,1M pH 7,4. Finalmente se mide la concentración de la proteína en cada fracción.

La determinación de la concentración de la proteína reducida se realiza por el método espectroscópico de absorción ultravioleta y se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Proteína (mg/mL)} = A_{280} (\text{Factor de Dilución}) / E_{280}$$

Donde:

- a) E_{280} , es el Coeficiente de extinción molar del anti-CEA para 1 mg/mL es igual a 1,44
- b) A_{280} es igual a la absorbancia leída en el espectrofotómetro a 280 nm en una celda de 1 cm. de paso óptico.
- c) Factor de dilución es igual a 10

Se unen las fracciones cuya concentración de proteína fue mayor o igual a 0,8 mg / mL y se calcula nuevamente la concentración de proteína reducida en el pool obtenido; este pool se esteriliza por filtración en membrana (0,22 μ m) y se refrigera inmediatamente (2 a 8 °C).

2.1.2 Formulación y liofilización del kit Anti-CEA

Se prepara las siguientes soluciones, Solución A: 5 mg de MDP en 2,5 mL de solución fisiológica en 15 mL de agua bidestilada y nitrogenada por 15 minutos; Solución B: 3,57 mg de SnF₂ en 15 mL de agua bidestilada y nitrogenada por 15 minutos; Solución C: 1 mL de cada solución A y B se mezclan, esta solución contiene 1 mg de MDP y 119 μ g de SnF₂ por mL.

El pool obtenido en el numeral 2.1.1, se retira de la refrigeradora y se dispensa 1,2 mg de Anti-CEA reducido por vial; luego se adiciona 50 μ L de la solución C. El fraccionamiento se realiza en atmósfera de nitrógeno gaseoso e inmediatamente los viales se congelan con nitrógeno líquido y seguidamente se colocan en el liofilizador. El proceso de liofilización se inicia con 4 horas de congelamiento a $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$, transcurrido este tiempo empieza el secado primario y luego el secundario, subiendo la temperatura lentamente hasta que alcance los $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ al final de las 16 horas y se mantiene a esa temperatura por dos horas. Al término del proceso de liofilización los viales que contienen el liofilizado, se sellan en atmósfera inerte con nitrógeno gaseoso e inmediatamente se conservan entre $2\text{ a }8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se obtuvo un polvo liofilizado de Anti-CEA, más agente reductor y ligante (kit), listo para ser marcado con Tc 99m.

2.2 Síntesis del radioinmunoconjugado, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Anti-CEA

Al kit liofilizado de Anti-CEA se le adiciona 1 a 2 mCi de Tc 99m (MEC) en un volumen de 1 mL. Se agita hasta disolución del polvo liofilizado y se deja reaccionar por 30 minutos a temperatura ambiente. Se obtiene una solución incolora y límpida del radioinmunoconjugado, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Anti-CEA.

2.3 Determinación de condiciones extremas de marcación con Tc 99m (MEC)

Se determinan las condiciones extremas de marcación como son: volumen y actividad máxima de Tc 99m (MEC), que soporta el kit liofilizado.

Un primer grupo de 4 kits se disuelven con 1; 2; 3 y 5 mL de solución de Tc 99m (MEC) con 1 mCi. Un segundo grupo de 4 kits se disuelven con 1 mL de Tc 99m (MEC) con actividades crecientes de 1; 10; 30 y 50 mCi. Luego se agita suavemente hasta disolución del polvo liofilizado y se deja reaccionar por 30 minutos a temperatura ambiente. Se obtiene una solución incolora y límpida del radioinmunoconjugado, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Anti-CEA. Se determina la pureza radioquímica de cada kit, según metodología a describir en el numeral 2.4.1.1.

2.4 Evaluación del radioinmunoconjugado, ^{99m}Tc -Anti-CEA

Se realiza la evaluación de la formulación desarrollada marcada con Tc 99m (MEC), para garantizar que esta formulación cumpla con las características de diseño, pureza, inmunoreactividad, estabilidad “*in vitro*” e inocuidad requerida para su uso potencial en diagnóstico clínico. Para ello se realiza la síntesis del radioinmunoconjugado según método, numeral 2.2, descrito en esta sección.

2.4.1 Pureza radioquímica

Las técnicas cromatográficas son los métodos aceptados para la determinación de la pureza radioquímica (PRQ) de compuestos radiomarcados. Se utilizaron dos métodos para determinar la PRQ del ^{99m}Tc –Anti-CEA, como la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y la cromatografía instantánea en fibra de vidrio impregnada con sílica gel (ITLC-SG)²³.

2.4.1.1 Cromatografía instantánea en capa delgada (ITLC-SG)

Los sistemas cromatográficos que se utilizan para determinar la pureza radioquímica por ITLC-SG se muestra en la tabla 3. Como soporte se utiliza tiras de ITLC-SG (1 x 10 cm.) y como solventes cromatográficos se utilizan cloruro de sodio 0,9%, metiletilcetona (MEC) y la mezcla etanol: amoníaco: agua (2:1:5); se utilizan dos tiras de ITLC-SG por cada sistema cromatográfico. Para el sistema etanol-amoniaco-agua / ITLC-SG, se prepara una solución de seroalbúmina humana al 0,5% en suero fisiológico y dos tiras de ITLC.SG se sumergen previamente en esta solución por 2 minutos, e inmediatamente se sumergen en agua destilada por 1 minuto y luego se seca a temperatura ambiente.

Una gota del radioinmunoconjugado, ^{99m}Tc -Anti-CEA, se siembra sobre cada tira de ITLC-SG (2 tiras por cada sistema cromatográfico); se deja secar a temperatura ambiente; enseguida se introduce en una cuba cromatográfica y se sumerge en el solvente, cuidando que el punto de siembra no entre en contacto con el solvente.

Cuando el solvente ha emigrado hasta la distancia deseada, se saca la tira de la cuba, secarlo a 70 °C y córtalo en segmentos de 1 cm., los cuales se miden individualmente en un contador automático gamma. Se calcula el porcentaje de pureza radioquímica del ^{99m}Tc -Anti-CEA, en función de la radiactividad encontrada en los diferentes sistemas cromatográficos, según los R_f que se describen en la Tabla 3; y se utiliza la siguiente fórmula:

$$\% \text{ } ^{99m}\text{Tc-Anti-CEA} = 100 - (\% \text{ } ^{99m}\text{TcO}_2 + \% \text{ } ^{99m}\text{Tc-MDP} + \% \text{ } ^{99m}\text{TcO}_4^-)$$

Tabla 3. Sistemas Cromatográficos y Relación de Frente (R_f), para cada especie radioquímica

Especie Radioquímica	Relación de Frente (R_f)		
	NaCl 0,9%	Acetona o MEC	EtOH:NH₃:H₂O
^{99m}Tc reducido e hidrolizado	0,0	0,0	0,0
^{99m}Tc -Anti-CEA	0,0	0,0	0,5 – 1,0
^{99m}Tc -MDP	1,0	0,0	1,0
$^{99m}\text{TcO}_4^-$	1,0	1,0	1,0

2.4.1.2 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

Se utilizó un sistema de HPLC; que consta de un integrador de picos, detector UV, un inyector manual y una bomba cuaternaria. También una columna de exclusión molecular Protein Pak SW 300 (7,5 mm diámetro interno x 30 cm. largo). Además, se le ha acoplado un detector radiométrico de INa (TI) de 3" x 3" tipo pozo, cuya salida electrónica se conecta a un integrador de pulsos y este a su vez se acopla a una computadora que tiene un software S100-Canberra, que permite obtener los radiocromatogramas en función del tiempo de retención. Ver tabla 4.

Tabla 4. Condiciones del análisis radioquímico por HPLC

Eluyente	Buffer fosfato 10 mM, pH 7,2 – 7,4
Velocidad de Flujo	1 mL / min.
Columna	Protein pak SW300 Waters
Detector	Radiométrico
Especies Radioquímicas	Tiempos de retención:
^{99m}Tc - agregados	4 – 5 min.
^{99m}Tc - Anti-CEA	7 – 7.5 min.
^{99m}Tc - MDP	11 – 12 min.
$^{99m}\text{TcO}_4^-$	13 – 14 min.

Dependiendo de la radiactividad, se inyecta una alícuota de 20 μL del radioinmunoconjugado, ^{99m}Tc -Anti-CEA, en el HPLC y se eluye con buffer fosfato a un flujo de 1 mL / min. Al cabo de 20 minutos, se obtiene un radiocromatograma que evidencia los picos de las especies radioquímicas. Cada pico es integrado y cuantificado por el software S100-CANBERRA, que permite calcular los porcentajes de cada especie radioquímica de acuerdo a los tiempos de retención mencionados en la Tabla 4.

Asimismo, se cuantifica el porcentaje de ^{99m}Tc -hidrolizado y reducido ($^{99m}\text{TcO}_2$), retenido en la columna de exclusión molecular, para ello se mide la recuperación de la radiactividad de la siguiente manera: En una fiola de 25 mL, se vierte 10 mL de buffer fosfato y con una jeringa para HPLC se adiciona 20 μL del radioinmunoconjugado, luego se afora con buffer fosfato. De esta solución estándar, se inyecta 20 μL en el HPLC y se eluye con buffer fosfato a un flujo de 1 mL/min. Se colecta el eluido de la columna en una fiola de 25 mL hasta el aforo (solución problema). En dependencia del grado de radiactividad, se toman alícuotas iguales de ambas soluciones y se miden en un contador de pozo. Se calcula el porcentaje de recuperación dividiendo la radiactividad de la solución problema entre la radiactividad de la solución estándar y se multiplica por 100.

2.4.2 pH de marcación

El método utilizado para la medición del pH de marcación, es el método colorimétrico que se describe en el Handbook of Radiopharmaceutical Quality Control ²⁵. Una alícuota del ^{99m}Tc -anti-CEA se siembra uniformemente sobre la tira indicadora, se espera 1 minuto, luego se compara el color obtenido con la escala patrón de un rango de 0 – 14.

2.4.3 Distribución biológica en animales de experimentación

Se utilizan ratones de cepa CFW normales, de 20 a 35 g de peso. En la vena caudal de la cola se inyecta $15 \pm 5 \mu\text{g}$ de ^{99m}Tc -anti-CEA en un volumen de 50 a 100 μL . Un volumen igual al que se inyecta al ratón se diluye con solución salina en un matraz aforado de 25 mL. Esta solución estándar representa el total de la radiactividad administrada que se utiliza para calcular el porcentaje de radiactividad por órgano de tejido. Luego de 4 horas se sacrifican los animales por tracción cervical y se extraen el hígado, riñones, corazón, bazo, fémur, intestino grueso y delgado, pulmones, estómago, músculo y sangre.

Cada órgano se lleva al contador gamma para medir su radiactividad, al mismo tiempo, se mide 1 mL de la solución estándar. A todas las cuentas radiactivas se les corrige el fondo, geometría y decaimiento radiactivo; luego se calcula y expresa el porcentaje de las dosis inyectada por órgano (% DI/órgano), según procedimiento descrito en el Manual de Control de Calidad de Radiofármacos^{27,28}.

2.4.4 Inmunoreactividad

Dado que la principal característica del anticuerpo es su capacidad de unirse en forma selectiva a un antígeno, es importante determinar la fracción inmunoreactiva del radioinmunoconjugado, ^{99m}Tc-Anti-CEA. El método que se utiliza es la cromatografía de afinidad en capa fina (CACF), descrita por ARCAL LII²³ y modificada por Ramos y Robles⁴⁶.

Se activan 4 tiras de ITLC-SG (1 x 10 cm.) a 110 °C por 30 min. Se preparan dos tiras con **antígeno positivo**: se siembra 200 µL del antígeno CEA (10 µg/mL), sobre cada tira de ITLC-SG activada, aproximadamente a 3 cm. de la parte inferior de esta y se deja por 30 minutos para que el antígeno se impregne. Posteriormente, las tiras se sumergen en una solución de seroalbúmina humana 0,5% en suero fisiológico por 2 minutos, luego se sumergen en agua bidestilada por 1 minuto, finalmente secarlos completamente a 37°C. Se preparan dos tiras de ITLC-SG con **antígeno negativo**: se siembra 200 µL de suero fetal bovino en cada tira y se les da el mismo tratamiento que a las tiras con antígeno positivo.

Se disuelve el kit liofilizado de Anti-CEA con 5 mL de solución de Tc 99m (MEC) y se deja reaccionar por 30 minutos a temperatura ambiente. Se sacan alícuotas de 1 a 2 µL (0,2 a 0,4 µg de Anti-CEA) y se diluyen a 10 µL con suero fetal bovino. Los 10 µL se colocaron sobre cada tira de antígeno positivo como antígeno negativo. Las cromatografías se desarrollan en buffer fosfato salino 10mM, que contiene etanol al 4%, hasta aproximadamente 9 cm.

Se calcula el porcentaje de fracción inmunoreactiva (%FI) utilizando la siguiente fórmula:

$$\%FI = (O / T) 100 - \% UI$$

Donde:

- a) O, es actividad en el origen de la tira con antígeno positivo menos la actividad de fondo.
- b) T, es actividad total aplicada en la tira con antígeno positivo menos la actividad de fondo.
- c) %UI, (actividad en el origen/ actividad total) 100, de la tira antígeno negativo.

2.4.5 Estabilidad “*in vitro*”: Desafío contra L-Cisteína

Para evaluar la estabilidad “*in vitro*” del radioinmunoconjugado, ^{99m}Tc -Anti-CEA, se realizan desafíos contra un exceso molar de L-Cisteína frente al AcMo, siendo las relaciones molares de CYS: AcMo 100: 1 y 1000:1. Estas se incuban a 37 °C por 4 y 24 horas, y se analizan por cromatografía en tiras de ITLC-SG utilizando como solvente cloruro de sodio al 0,9%. La metodología utilizada se describe en el numeral 2.4.1.1 y el Rf del ^{99m}Tc -Cys es de 1,0.

2.5 Estudios de estabilidad

Se pueden esperar varios tipos de descomposición de la formulación desarrollada, siendo las principales causas: la hidrólisis y la oxido- reducción, para el kit liofilizado de Anti-CEA; así como la autoradiólisis para el radioinmunoconjugado, ^{99m}Tc -Anti-CEA. Este estudio comprende la evaluación de la formulación liofilizada y del radioinmunoconjugado en tiempo real; siendo la variable crítica la pureza radioquímica (PRQ), que permite evaluar la estabilidad química y bioquímica de dicha proteína.

Este estudio se realiza a los 4 lotes experimentales, preparados según formulación desarrollada en el presente trabajo y descrita en el numeral 2.1; los lotes se identifican como L-01; L-02; L-03 y L-04, los cuales se almacenan entre 2 a 8°C.

2.5.1 Estabilidad del kit liofilizado de Anti-CEA

El estudio de estabilidad se realiza en tiempo real por un periodo de 13 meses, a los 4 lotes experimentales. Los kits de Anti-CEA liofilizado de cada lote experimental se marcan con Tc 99m (MEC), según procedimiento descrito en el numeral 2, luego se determina la pureza radioquímica por cromatografía en ITLC-SG, descrita en el numeral 2.4.1.1. El tratamiento estadístico de los datos de PRQ, se realiza mediante el programa EXCEL y se elaboran gráficos de porcentajes de PRQ versus tiempo de cada lote en estudio, y se observan las tendencias entre ellas.

Debido a que las formulaciones liofilizadas contienen agua en mayor o menor proporción, es necesario conocer el porcentaje de agua ligada a la proteína. Así pues, el contenido de agua ligada (humedad) se determina por el método de pérdida de peso con estufa de vacío a 70 °C por 3 horas. Se calcula el porcentaje de humedad dividiendo el peso del polvo liofilizado seco entre el peso del polvo liofilizado húmedo y multiplicado por 100.

2.5.2 Estabilidad del radioinmunoconjugado, ^{99m}Tc-Anti-CEA

La estabilidad del radioinmunoconjugado se realiza a temperatura ambiente. Al kit liofilizado de Anti-CEA, se adiciona 1,48 – 1,85 Bq (40 - 50 mCi) de Tc 99m (MEC) en un volumen de 1 mL. Se agita hasta disolución del polvo liofilizado y se deja reaccionar. Los tiempos de reacción que se evalúan son: 0,5; 2; 4; 6 y 24 horas. Para cada tiempo se determina la pureza radioquímica según metodología descrita en el numeral 2.4.1.1; así como, las impurezas radioquímicas presentes en el radioinmunoconjugado. Con los resultados obtenidos se elabora un gráfico de porcentajes de pureza radioquímica versus tiempo para evaluar la estabilidad radioquímica del ^{99m}Tc-Anti-CEA.

III. RESULTADOS

Los resultados de pureza radioquímica por ITLC-SG, de las especies radioquímicas formadas en la marcación con Tc 99m (MEC) de las formulaciones experimentales liofilizadas: 1; 2; 3 y 4*, en la **Tabla 5**, se evidencia la influencia de la relación molar del AcMo: 2-ME sobre la formación de tecnecio libre ($^{99m}\text{TcO}_4^-$). Para la formulación N° 1, con una relación molar de 1:1000, se obtiene un alto porcentaje de tecnecio libre, $^{99m}\text{TcO}_4^-$, sin unirse al AcMo del 16,25 %; así como, la formación de Tecnecio reducido e hidrolizado, $^{99m}\text{TcO}_2$, del 10,65 %. Al incrementarse la relación molar del agente reductor, 1:2000, en la formulación N° 2; se observa una disminución notable del $^{99m}\text{TcO}_4^-$ del 6,70 %, las otras especies radioquímicas como el $^{99m}\text{TcO}_2$ y $^{99m}\text{Tc-MDP}$, se obtienen valores menores al 2%.

Sin embargo, aún cuando en la formulación N° 2 se logra una pureza radioquímica mayor del 91 % como $^{99m}\text{Tc-Anti-CEA}$, es necesario que el porcentaje del tecnecio libre disminuya a valores menores del 5%. Por tal motivo, se ha incrementado la cantidad de fluoruro estañoso anhidro, agente reductor, de 3,5 a 5,9 μg por mg de proteína reducida. En la formulación N° 3, se evidencia que al incrementar la cantidad de agente reductor el porcentaje obtenido de tecnecio libre ha disminuido significativamente de 6,70 % a 3,05 % y la pureza radioquímica del radioinmunoconjugado, $^{99m}\text{Tc-Anti-CEA}$, se incrementa del 91, 92 % al 94,28 %. El porcentaje del $^{99m}\text{Tc-MDP}$, se incrementa de 0,38% a 1,63%; y el porcentaje de $^{99m}\text{TcO}_2$ permanece casi constante.

Sobre la base del resultado obtenido en el porcentaje de $^{99m}\text{Tc-MDP}$, se decide minimizar este porcentaje incrementando la cantidad de proteína reducida, Anti-CEA, de 1 a 1,2 mg por vial, en la formulación N° 4. Los resultados obtenidos en esta última formulación evidencian que el porcentaje de $^{99m}\text{Tc-MDP}$ disminuye del 1,63 % a 0,10%; mientras que el $^{99m}\text{TcO}_2$ disminuye a valores menores del 1%. El porcentaje de tecnecio libre es menor del 3% y la pureza radioquímica del $^{99m}\text{Tc-Anti-CEA}$ continua incrementándose del 94,28 % al 97, 23%. Asimismo, el pH de marcación se mantuvo entre 7,0 y 7,5, en las cuatro formulaciones.

Tabla 5. Efecto de las variables: relación molar AcMo:2-ME, cantidad de agente reductor y proteína reducida; sobre la variable: pureza radioquímica, en las diferentes formulaciones liofilizadas.

VARIABLES	FORMULACIONES MARCADAS CON Tc 99m (MEC)			
Variable Independiente	1	2	3	4*
Relación Molar (AcMo: 2ME)	1:1000	1:2000	1:2000	1:2000
Formulación Cuantitativa por Kit				
Anti-CEA red. (mg)	1	1	1	1,2
Fluoruro estañoso (μg)	3,5	3,5	5,95	5,95
Variable Constante				
Acido metilén difosfónico (μg)	50			
Variable Dependiente	% Pureza Radioquímica (ITLC-SG), n = 2			
^{99m} Tc-Anti-CEA	71,40 (±3,27)	92,09 (±2,56)	94,28 (±1,21)	97,23 (±0,18)
^{99m} TcO ₄ ⁻	16,25 (±2,56)	6,70 (±0,87)	3,05 (±0,10)	2,80 (±0,22)
^{99m} TcO ₂	10,65 (±1,54)	0,84 (±0,31)	1,04 (±0,46)	0,78 (±0,13)
^{99m} Tc-MDP	1,26 (±0,28)	0,38 (±0,11)	1,63 (±0,19)	0,01 (±0,00)
²⁷ Pureza Radioquímica ^{99m} Tc-AcMo debe ser > 90 % y < 110%				
pH marcación	7,0 a 7,5			

(*) Formulación liofilizada de Anti-CEA, desarrollada en el presente trabajo, para ser marcada con Tc 99m, radionucleido extraído con MEC.

La pureza radioquímica se ha realizado de acuerdo al método 2.4.1.1, descrito en Materiales y Métodos.

Los resultados de pureza radioquímica para los 4 lotes experimentales: L-01; L-02; L-03 y L-04, preparados con la formulación N° 4 y marcados con Tc 99m (MEC) son mostrados en la **Tabla 6**, donde se aprecia que la PRQ para el ^{99m}Tc -Anti-CEA es mayor del 95%, en los todos los lotes experimentales. Las otras especies radioquímicas, consideradas impurezas, como el $^{99m}\text{TcO}_2$ y $^{99m}\text{TcO}_4^-$ se obtienen porcentajes menores al 2% y para el ^{99m}Tc -MDP, se encontraron porcentajes menores al 0,4 %. Además, el pH de marcación se mantuvo entre 7,0 - 7,5 en los 4 lotes experimentales.

Tabla 6. Evaluación del porcentaje de pureza radioquímica del ^{99m}Tc -Anti-CEA y sus impurezas radioquímicas, en 4 lotes experimentales liofilizados, según formulación desarrollada (N° 4).

Especies radioquímicas	L-01	L-02	L-03	L-04
^{99m}Tc -Anti-CEA	97,49 ($\pm 0,33$)	97,82 ($\pm 0,40$)	98,12 ($\pm 0,24$)	96,04 ($\pm 0,20$)
$^{99m}\text{TcO}_4^-$	1,54 ($\pm 0,28$)	0,99 ($\pm 0,12$)	1,05 ($\pm 0,31$)	1,85 ($\pm 0,69$)
$^{99m}\text{TcO}_2$	0,69 ($\pm 0,04$)	1,40 ($\pm 0,12$)	0,68 ($\pm 0,14$)	1,79 ($\pm 0,66$)
^{99m}Tc -MDP	0,28 ($\pm 0,01$)	0,00 ($\pm 0,00$)	0,16 ($\pm 0,09$)	0,33 ($\pm 0,10$)
pH marcación: 7,0 – 7,5				
²⁷ Pureza radioquímica ^{99m}Tc -AcMo debe ser > 90 % y < 110%				

Se ha estudiado el efecto del incremento de la actividad y volumen del Tc 99m (MEC) en la marcación del kit liofilizado. En la **Tabla 7**, se presenta el efecto del incremento de actividad de Tc 99m (MEC), donde la pureza radioquímica del ^{99m}Tc -Anti-CEA es mayor del 96 % hasta una actividad de 50 mCi.

Tabla 7. Efecto del incremento de la actividad de Tc 99m, sobre la pureza radioquímica del ^{99m}Tc -Anti-CEA (%)

Actividad	1mCi	10 mCi	30 mCi	50 mCi
^{99m}Tc -Anti-CEA	97,77 ($\pm 0,83$)	97,36 ($\pm 0,93$)	97,10 ($\pm 1,61$)	96,64 ($\pm 2,40$)
²⁷ Pureza radioquímica ^{99m}Tc -AcMo debe ser > 90 % y < 110%				

n = 2, lotes experimentales.

En la **Tabla 8**, se presenta el efecto del incremento del volumen de Tc 99m (MEC), donde la pureza radioquímica del ^{99m}Tc -Anti-CEA es mayor del 95 % hasta un volumen de 5 mL.

Tabla 8. Efecto del incremento del volumen de Tc 99m, sobre la pureza radioquímica del ^{99m}Tc -Anti-CEA (%)

Volumen	1 mL	2 mL	3 mL	5 mL
^{99m}Tc -Anti-CEA	97,77 ($\pm 0,83$)	97,36 ($\pm 0,93$)	97,10 ($\pm 1,61$)	96,64 ($\pm 2,40$)
²⁷ Pureza radioquímica ^{99m}Tc -AcMo debe ser > 90 % y < 110%				

n = 2, lotes experimentales.

Con respecto al comportamiento radioquímico del radioinmunoconjugado, ^{99m}Tc -Anti-CEA, por dos métodos cromatográficos, en la **Tabla 9** se observa que la diferencia absoluta entre los valores promedios obtenidos en la pureza radioquímica para el ^{99m}Tc -Anti-CEA, es menor del 0,51 %; para el $^{99m}\text{TcO}_4^-$ es menor del 0,65 %, ^{99m}Tc -MDP es menor del 0,11 % y para el $^{99m}\text{TcO}_2$ es menor del 0,81 %.

Tabla 9. Evaluación de la Pureza Radioquímica por dos métodos cromatográficos: Cromatografía Instantánea en Capa Fina (ITLC-SG) y Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC).

Formulación N°	3		4	
Especies Radioquímicas (%)	ITLC-SG	HPLC	ITLC-SG	HPLC
^{99m} Tc- Anti-CEA	94,28 ± 1,21	93,17 ± 2,01	97,23 ± 0,18	97,10 ± 0,41
^{99m} TcO ₄ ⁻	3,05 ± 0,10	2,82 ± 0,78	2,80 ± 0,22	2,18 ± 0,48
^{99m} TcO ₂	1,04 ± 0,46	1,85 ± 0,15	0,78 ± 0,13	0,62 ± 0,15
^{99m} Tc-MDP	1,63 ± 0,19	1,52 ± 0,22	0,00 ± 0,00	0,10 ± 0,00
	n = 2		n = 2	
²⁷ Pureza radioquímica ^{99m} Tc-AcMo debe ser > 90% y < 110%.				

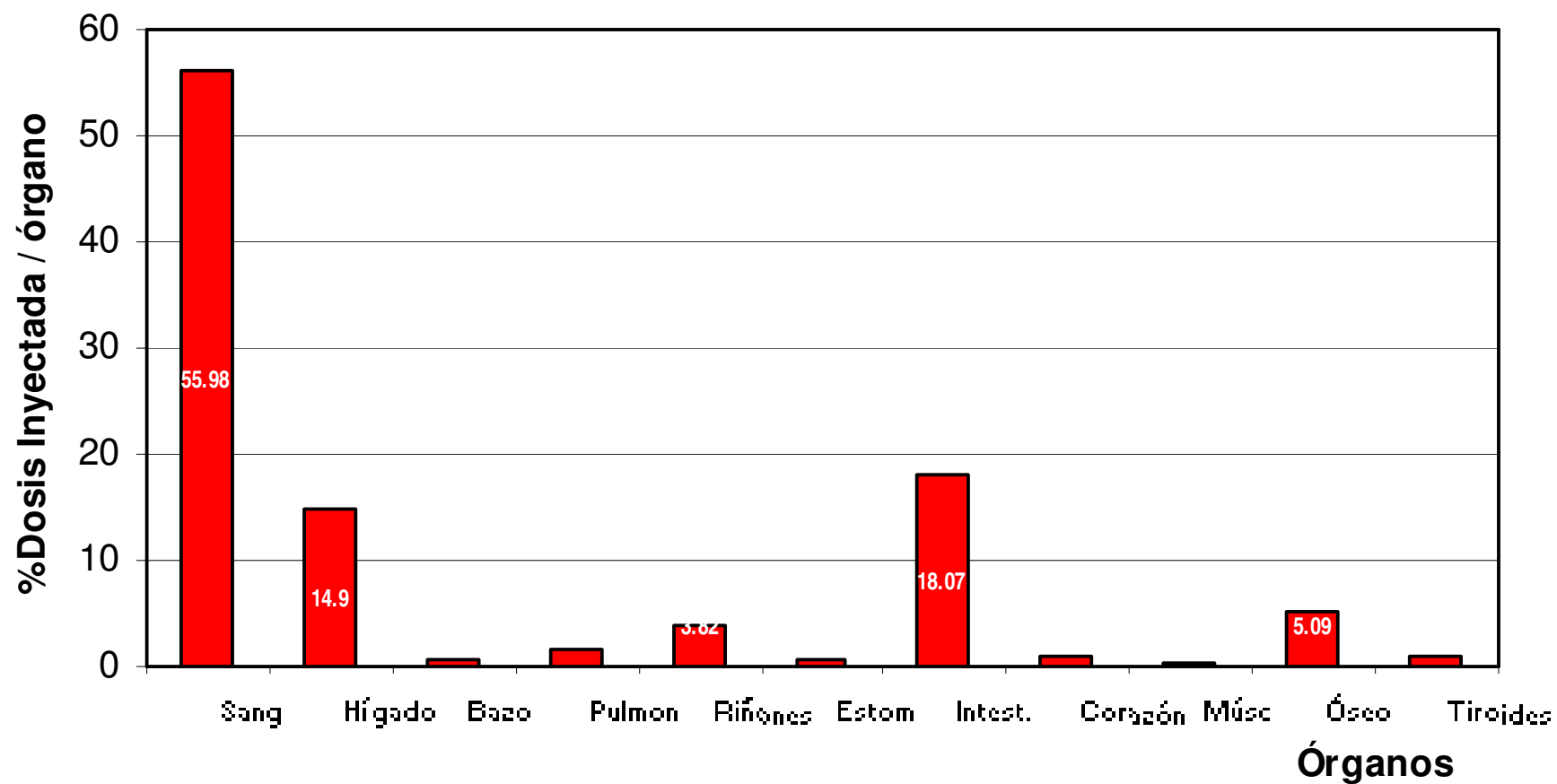
La estabilidad *in vitro* se ha evaluado a través del desafío o competencia contra la L-Cisteína. Los resultados son mostrados en la **Tabla 10**, para una relación molar de 1:100, se observa que el radioinmunoconjugado, ^{99m}Tc -Anti-CEA, se disocia a pH neutro, la disociación del ^{99m}Tc del AcMo es del 5,56% a las 4 horas y 10,45 % a las 24 horas. Para una relación molar de 1:1000, el porcentaje de disociación, es 7,05% a las 4 horas y se incrementa a 15,75% a las 24 horas. En las primeras 4 horas se observa que la disociación es menor del 10 %, para las dos relaciones molares, lo que equivale a decir, que el 90% se encuentra como ^{99m}Tc -Anti-CEA.

Tabla 10.- Competencia del ^{99m}Tc -Anti-CEA contra la L-cisteína a diferentes relaciones molares

AcMo : L-cisteína	Porcentaje de disociación (^{99m}Tc -Cys)	
	4 horas	24 horas
1:100	5,56 \pm 1,20	10, 45 \pm 0,92
1:1000	7,05 \pm 1,52	15,75 \pm 1,62

Se estudio el comportamiento biológico, “*in vivo*”, del ^{99m}Tc -Anti-CEA en animales de experimentación. En el **Gráfico 1**, los porcentajes de dosis inyectada por órgano (%D.I / Org.) en función de cada órgano, a las 4 horas post-inyección son los siguientes: Es alto en sangre 55,98 \pm 7,21%; este radioinmunoconjugado se ha acumulado en el hígado 14,90 \pm 2,38%; es alta en intestino 18,07 \pm 0,75%, y en riñones 3,82 \pm 0,43%. En estómago y tiroides menor al 1%. No se ha evidenciado acumulación significativa en otros órganos y no se observaron reacciones adversas en los animales de experimentación (Anexo N° 8).

Gráfico 1. Distribución Biológica del ^{99m}Tc -Anti-CEA en ratones sanos, sacrificados a las 4 horas post-inyección



Los resultados de la evaluación de la inmunoreactividad del ^{99m}Tc -Anti-CEA, son mostrados en la **Tabla 11**, puede observarse que el porcentaje de fracción inmunoreactiva (%FI) del radioinmunoconjugado ^{99m}Tc -Anti-CEA, contra su antígeno CEA es del $78,32 \pm 4,35\%$ y el porcentaje de unión inespecífica es del $18,26 \pm 8,37 \%$. Ver Anexo N° 9.

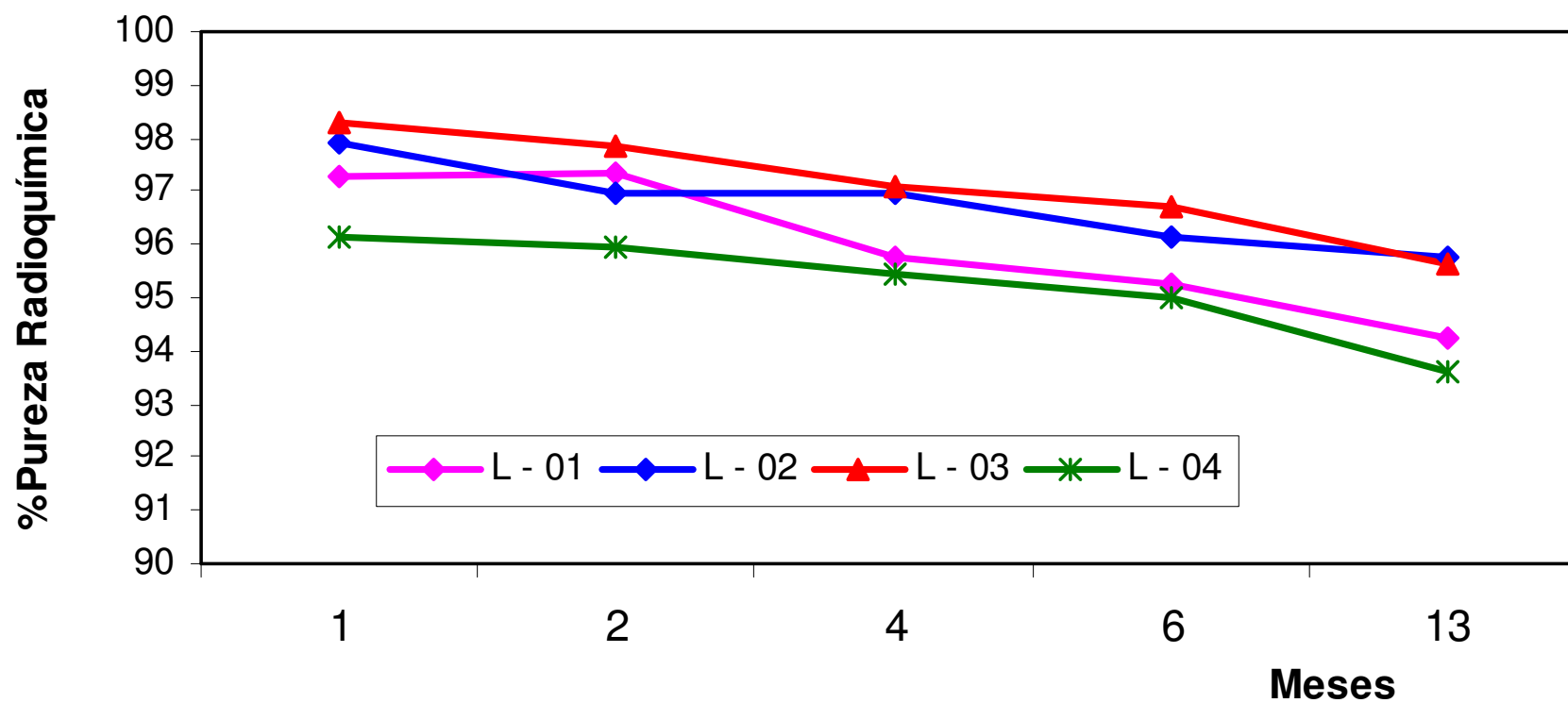
Tabla 11. - Inmunoreactividad del ^{99m}Tc -Anti-CEA, contra su antígeno CEA

	ENSAYO N°	
	1	2
% Control Positivo CEA	95,01 %	98,14 %
% Control Negativo SBF	12,34 %	24,17 %
% Unión Inespecífica	12,34 %	24,17 %
% Fracción Inmunoreactiva, F.I (% Unión Específica)	82,67 %	73,97 %

	$\bar{X} \pm \sigma_{n-1}$
% Unión Inespecífica	$18,26 \pm 8,37 \%$
% Fracción Inmunoreactiva, F.I (% Unión Específica)	$78,32 \pm 4,35 \%$

En el estudio de estabilidad. En el **Gráfico 2**, el porcentaje de pureza radioquímica versus tiempo fue graficado para cada lote experimental. Se obtienen rectas con pendiente negativas y con una misma tendencia, y mantuvieron una pureza radioquímica, ^{99m}Tc -Anti-CEA, mayor del 94% por un periodo de 13 meses post-liofilización y almacenados entre 2 a 8 °C.

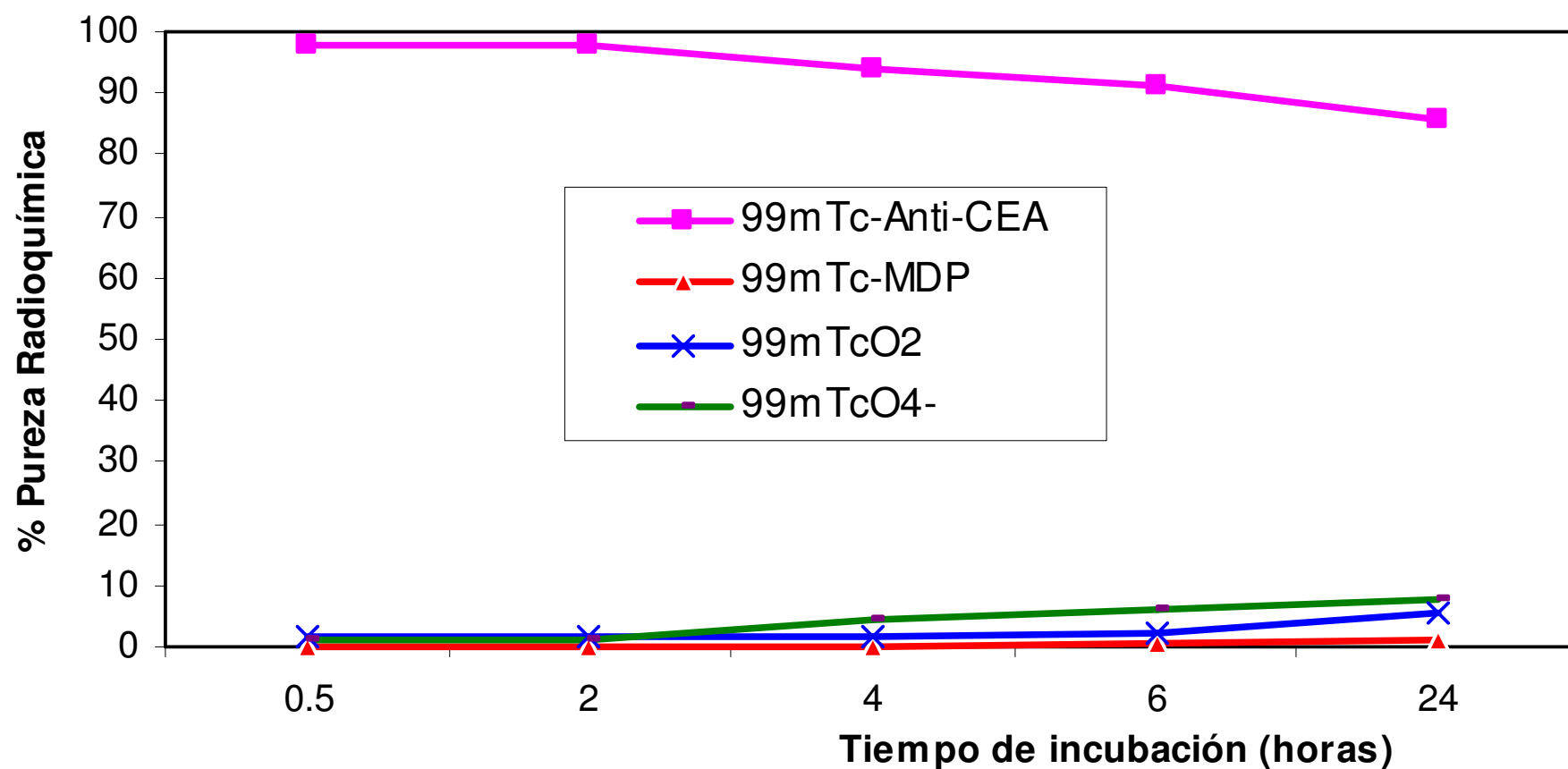
**Gráfico 2. Estabilidad del kit liofilizado de Anti-CEA,
almacenado entre 2 a 8°C
(%^{99m}Tc-Anti-CEA Vs Tiempo real)**



Asimismo, se obtuvo el porcentaje de humedad de cada lote experimental, siendo los resultados fueron los siguientes: L-01: $4,95 \pm 0,23$ %; L-02: $4,47 \pm 0,41$ %; L-03: $3,79 \pm 0,31$ % y L-04: $4,52 \pm 0,38$ %. Los porcentajes de humedad obtenidos en todos los lotes experimentales fueron menores del 5%. Además las características organolépticas del liofilizado se mantuvieron inalterables, tales como: polvo liofilizado de color blanco.

El comportamiento cinético del radioinmunoconjugado y sus impurezas radioquímicas a diferentes tiempos de incubación: 0,5; 2; 4; 6 y 24 horas. En el **Gráfico 3**, se aprecia que el ^{99m}Tc -Anti-CEA, mantuvo una pureza radioquímica mayor del 90 % en las primeras 6 horas, a las 24 horas dicho porcentaje disminuye a 85 %; el porcentaje de tecnecio libre, $^{99m}\text{TcO}_4^-$, y el tecnecio reducido e hidrolizado, $^{99m}\text{TcO}_2$, son menores del 5 % en las primeras 4 horas, luego se van incrementando hasta alcanzar valores cercanos al 10 % a las 24 horas; mientras que El ^{99m}Tc -MDP, se mantiene por debajo del 0,5 % durante las 24 horas.

**Gráfico 3. Comportamiento Cinético de los diferentes ^{99m}Tc -
Compuestos Involucrados durante la síntesis del ^{99m}Tc -Anti-CEA**



IV. DISCUSION DE RESULTADOS

Los anticuerpos monoclonales marcados con radionucleidos han sido investigados durante la última década. En la actualidad estos son utilizados en la medicina nuclear para obtener imágenes de tumores malignos. Nuevos anticuerpos para diagnóstico y terapia son producidos continuamente y nuevos métodos de marcación han sido desarrollados para obtener radiofármacos de alta calidad y con una buena estabilidad *in vivo* e *in vitro*. Los métodos de marcación dependen principalmente del anticuerpo y del radionucleido. La selección del radionucleido depende de sus propiedades físicas y naturalmente del costo y disponibilidad en el país. Para la marcación de anticuerpos monoclonales con tecnecio 99m existen algunos métodos directos que han sido reportados por algunos investigadores, con resultados satisfactorios^{16,21,35,36}. Sin embargo lograr una marcación óptima puede requerir algunas modificaciones experimentales en dependencia del radionucleido, del agente reductor, del agente ligante y de la proteína. Asimismo, La eficiencia de marcación de los radiofármacos del ^{99m}Tc obtenidos a partir de kit liofilizados, se determina a través de la Pureza Radioquímica que permite determinar el porcentaje de unión entre el componente principal o activo y el radionucleido, para obtener un radiofármaco ideal para su aplicación clínica.

Durante el desarrollo del kit liofilizado se han modificado algunos parámetros del método original descrito por Mather y Ellison²¹ y el reportado por ARCAL LII²³, con la finalidad de obtener un kit para ser marcado directamente con Tc 99m , proveniente de un generador de extracción con MEC, y producido en el país (Anexos N° 1 y 11). En la etapa de reducción se modifico la relación molar de AcMo:2-ME; en la etapa de formulación, se utilizaron reactivos libres de excipientes y estables como el ácido metilén difosfónico y fluoruro estañoso anhidro, y sus cantidades fueron incrementadas, con respecto al reportado en ARCAL LII, asimismo la cantidad de proteína reducida fue incrementada de acuerdo a los resultados obtenidos en forma sistemática para cada modificación. El efecto de cada modificación fue evaluada a través de la pureza radioquímica del radioinmunoconjugado, ^{99m}Tc -Anti-CEA.

Además, se ha evaluado la estabilidad *in vitro* e *in vivo* del kit liofilizado al ser marcado por el método directo con Tc 99m, en los 4 lotes experimentales preparados según la formulación desarrollada.

Proceso de reducción y purificación del Anti-CEA

Rhodes B.⁴⁷, demostró que reduciendo los puentes disulfuros a grupos sulfidrilos con cloruro de estaño se logra la marcación de anticuerpos murinos con Tc 99m, preservando la inmunoreactividad de la proteína. Schwarz y Steinstrabber¹⁶ utilizaron 2 – mercaptoetanol para reducir los puentes disulfuros a grupos sulfidrilos y eliminaron el exceso de reactivo por filtración molecular en gel. Los investigadores de ARCAL LII²³, mencionaron que la utilización de una columna PD10, en la etapa de purificación, asegura la reproducibilidad del método directo de marcación. No obstante, se pueden preparar columnas de Sephadex G25M o G50M empaquetadas en jeringas plásticas de 10 a 20 mL (Anexo N° 2).

La reducción de la proteína se realizó según procedimiento descrito por Schwarz y Steinstrabber¹⁶, el mismo que ha sido modificado al incrementar la relación molar del AcMo: 2-ME (Tabla N° 5, Formulación N° 1 y 2). La purificación se ha realizado por una columna PD10 para eliminar el exceso de 2-ME; con un porcentaje de recuperación mayor del 98% y una alta resolución de separación del 2-ME (Anexo N° 2).

En la etapa de reducción, al incrementar la relación molar del AcMo: 2-ME de 1:1000 a 1:2000, se logra incrementar la pureza radioquímica del 71 al 92 % y disminuir el porcentaje de tecnecio libre del 16,3 al 6,7 % (Tabla 5); este efecto es congruente, ya que el 2-ME reduce los puentes disulfuros (S-S) de la estructura nativa de la proteína, para transformarlos en grupos tioles libres los cuales se unen al ^{99m}Tc formando enlaces ^{99m}Tc-S-, utilizando al MDP como ligante débil, el cual facilita la introducción del ^{99m}Tc a la proteína.

No se ha incrementado la relación molar de AcMo: 2-ME a 1:3000, con la finalidad de obtener mayor cantidad de sitios de unión a la proteína, porque la reducción debe ser controlada, ya que de existir fragmentación se puede afectar la inmunoreactividad al provocar afectaciones en la región hipervariable o cambios estructurales que dificulten el reconocimiento del antígeno y se ha reportado pérdida de las propiedades inmunoreactivas²⁹.

Formulación y liofilización del Anti-CEA reducido

Se revisaron varias formulaciones reportadas por algunos investigadores que utilizaron cloruro estañoso y fosfonatos para reducir al Tc 99m y posteriormente unirlo al anticuerpo monoclonal reducido mediante el método directo. Schwarz y Steinstrabber¹⁶ utilizaron para la reducción del Tc 99m (pertechnetato de sodio) un kit comercial de pirofosfato de sodio que contenía una sal de estaño. Mather y Ellison²¹, reportaron la utilización de un kit comercial que contenían el cloruro estañoso y fosfonato (MDP-Sn). Castro y Ramírez³⁷, reportaron la utilización de un kit comercial AMD que contenía ácido metilén difosfónico, cloruro estañoso dihidratado y ácido ascórbico; todos ellos lograron obtener una pureza radioquímica mayor del 95%, en formulaciones no liofilizadas donde la marcación con Tc 99m se ha realizado en dos pasos. Crudo J. y Petzoldt I.^{38,39}, utilizaron como agente reductor, fluoruro estañoso, reactivo más estable que ha permitido obtener formulaciones liofilizadas de inmunoglobulina humana (IgG) para ser marcadas directamente con Tc 99m, con buenos resultados de pureza radioquímica.

El procedimiento de Mather y Ellison²¹ y el reportado por ARCAL LII²³, fue modificado para obtener un kit liofilizado de Anti-CEA; para esto se han diseñado 4 formulaciones sistemáticamente y se ha utilizado como agente reductor el fluoruro estañoso anhidro; porque se ha reportado que este reactivo es más estable que el cloruro de estaño dihidratado en kit liofilizados de IgG^{38,39}. Asimismo, se utilizó ácido metilén difosfónico (MDP), debido a que el kit comercial utilizados por otros investigadores³⁷,

contienen excipientes como ácido ascórbico, reactivo que se ha reportado como otro agente reductor para la reducción de anticuerpos monoclonales ³⁶, además se ha publicado que en presencia de Tc 99m, forma un complejo de ^{99m}Tc-ascorbato ⁴⁰; el cual estaría compitiendo con el agente ligante principal, ^{99m}Tc-MDP, responsable de transferir el Tc 99m al AcMo. Por tal motivo utilizar un kit comercial en una formulación liofilizada no es recomendable, porque no garantizaría la estabilidad *in vivo* e *in vitro* del kit liofilizado.

En la etapa de formulación, se incrementa la cantidad de agente reductor en el kit de 3,5 a 5,95 µg con la finalidad de disminuir el porcentaje de Tc 99m libre. Al incrementar la cantidad de fluoruro estañoso anhidro, se logra disminuir el porcentaje de tecnecio libre a un 3,05 % y se incrementa la pureza radioquímica a 94,28% como ^{99m}Tc-Anti-CEA (Tabla 5, Formulación N° 3). En efecto, el Sn II reduce al pertecnetato de sodio (Na^{99m}TcO₄) de valencia VII a formas de oxidación más bajas, como la valencia IV, que es altamente reactiva y que se une a cualquier molécula o ligando, obteniéndose el compuesto marcado ³⁰; este es el ^{99m}Tc-MDP. De acuerdo a otra publicación ⁹, para obtener moléculas marcadas con Tc 99m de alta pureza radioquímica, es necesario utilizar concentraciones altas de agente reductor para poder llevar a cabo la reacción redox reversible Tc⁺⁷/ Tc⁺⁴. Además, el uso de ^{99m}Tc (MEC), contribuye a incrementar la cantidad de ⁹⁹Tc, de acuerdo al decaimiento radiactivo del Molibdeno 99; este efecto de masa casi despreciable intervino también para incrementar la cantidad de fluoruro estañoso, con la finalidad de completar la reducción del pertecnetato e incrementar la estabilidad de la molécula marcada.

Asimismo, se observa que al incrementar la cantidad de fluoruro estañoso en la formulación N° 3, se incrementa el porcentaje de ^{99m}Tc-MDP de 0,38 a 1,63%; este intermediario es un ligante competitivo débil que tiene la función de preservar el estado de oxidación del Tc reducido (IV), para más tarde ser transferido a los sitios de enlazamiento de la proteína ²³. Cabe resaltar que el estado de oxidación del Tc 99m en proteínas complejas ha sido discutido extensamente y aún no está claro; el uso de estaño II como agente reductor sugiere que el estado de oxidación Tc 99m (IV) está presente ⁴³.

Con relación al agente ligante competitivo, ^{99m}Tc -MDP, es necesario minimizar la formación del mismo, si bien el porcentaje no es mayor del 2% puede afectar la calidad de la imagen inmunogammagráfica, porque esta molécula marcada se deposita en el sistema óseo ²⁸. Por lo tanto se decide aumentar los sitios de enlazamiento o de unión aumentando la cantidad de proteína de 1 a 1,2 mg (Tabla 5, Formulación N°4); obteniéndose una pureza radioquímica del 97,23 % y un porcentaje de ^{99m}Tc -MDP de 0,01%; las demás impurezas radioquímicas como el tecnecio hidrolizado y reducido alcanzan un porcentaje menor del 0,8% y el tecnecio libre se mantuvo en menos del 3%.

Con respecto al proceso de liofilización para proteína, se han revisado varias publicaciones reportadas por algunos investigadores; Petzoldt ⁴¹, ha determinado la temperatura de inicio de congelación para la liofilización de kits de macroagregados de albúmina humana e inmunoglobulinas gamma entre -32 a -36°C, respectivamente. ARCAL LII ²³, describe un ciclo de liofilización de 27 horas con una temperatura de inicio de congelación de -45°C por 4 horas y un secado por 23 horas hasta alcanzar una temperatura de 25°C, y reportan una estabilidad del liofilizado de 2 a 3 meses refrigerado entre 2 a 8°C. Posteriormente, Petzoldt ⁴² describe un programa de liofilización de 26 horas para un kit de macroagregado de albúmina humana, previamente congelados con nitrógeno líquido y utiliza un programa de liofilización con una temperatura inicial de congelación de -32° C por una hora y secado por 25 horas hasta alcanzar una temperatura 25°C; y reporta una estabilidad del liofilizado de 8 meses, con tendencia mayor a 1 año, refrigerado entre 2 a 8°C y con una humedad menor del 3%. Sobre la base de los revisado se desarrollo un programa de liofilización de 22 horas, que se inicia con una temperatura de congelamiento de -35° C por 4 horas, previa congelación con nitrógeno líquido, secado primario y secundario por aproximadamente 16 horas, alcanzando gradualmente una temperatura final de 20 °C y permaneciendo en esa temperatura por 2 horas (Anexo N° 3). Los resultados obtenidos con el programa de liofilización aplicado en este trabajo ha evidenciado una estabilidad del kit liofilizado de 13 meses entre 2 a 8°C y con una humedad menor del 5% en promedio para los 4 lotes experimentales preparados según formulación desarrollada; siendo comparable con los porcentajes de humedad obtenidos en kit liofilizados de inmunoglobulinas gamma (anticuerpo policlonal) y macroagregados de albúmina humana reportados en la literatura con valores menores al 5% ^{41,42}.

Marcación del anticuerpo monoclonal, Anti-CEA, con Tc 99m (MEC)

El método directo fue el seleccionado para la marcación del anticuerpo monoclonal con Tc 99m (MEC), por llevarse a cabo en un solo paso, los métodos indirectos se realizan en dos o tres pasos, lo cual no es conveniente porque en cada paso hay que preservar la naturaleza original del anticuerpo.

Este método de marcación ocurre directamente sobre los grupos sulfhidrilos en el anticuerpo reducido por acción del 2-ME. Para el anticuerpo del tipo IgG el cual contiene de 4 a 6 puentes disulfuros intercadena y numerosos puentes disulfuros intracadenas, el Tc 99m se enlaza a los grupos sulfhidrilos producidos por la reducción de puentes disulfuros ^{31,44} (Anexos N° 4 y 5). Además, se selecciono el tecnecio 99m por ser el radionucleido más utilizado en medicina nuclear y estar disponible en el país en la forma de solución de pertecnetato de sodio ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$), obtenido por extracción con MEC.

La pureza radioquímica del $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Anti-CEA obtenida en los 4 lotes experimentales, es mayor del 97%, a un pH de marcación entre 7,0 a 7,5. La formación de tecnecio libre ($^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$), y tecnecio hidrolizado y reducido ($^{99\text{m}}\text{TcO}_2$) son menores del 2 % y el porcentaje de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP, es menor del 0,4 %; como se aprecia en la Tabla 6. Los resultados radioquímicos mostrados en este trabajo, evidencian que la formulación de Anti-CEA marcada con Tc 99m (MEC) ha alcanzado valores similares con lo publicado en la literatura para generadores de adsorción (95%) ^{21,23}. la pureza radioquímica obtenida en este trabajo es comparable con otros radionucleidos como el I 131, Koga R.C ⁴⁵. reporto la marcación del Anti-CEA (IOR-CEA1) con ^{131}I por el método de la cloramina T y obtuvo una pureza radioquímica del 95,57%.

El Manual de Control de Calidad para Radiofármacos ²⁷, especifica que la pureza radioquímica para anticuerpos monoclonales marcados con Tc 99m debe ser mayor del 90 % y menor del 110%, como $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -AcMo, para garantizar su uso clínico. En el presente trabajo se ha alcanzado un valor promedio del 97%, como $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Anti-CEA, valor que se encuentra dentro de lo especificado en el manual.

La pureza radioquímica (PRQ) se ha determinado por cromatografía en ITLC-SG y HPLC. Los valores obtenidos de PRQ por ambos métodos cromatográficos tienen una diferencia absoluta menor del 1 %, como se aprecia en la Tabla 9. Por lo tanto, los resultados evaluados por ambos métodos cromatográficos para K=2, son veraces al 95% de confianza, es decir la diferencia entre los dos métodos cromatográficos no es significativa pudiéndose usar cualquiera de ellos para determinar la pureza radioquímica.

La cromatografía por HPLC frente a la de ITLC-SG, presenta una mejor resolución para la separación de impurezas radioquímicas presentes en el anticuerpo monoclonal, Anti-CEA, marcado con Tc 99m (Anexos N° 6, 7 y 8).

Evaluación del kit liofilizado de Anti-CEA

Formulaciones con pureza radioquímica mayor del 95% son sometidas a pruebas de control para evaluar las propiedades radioquímicas, biológicas e inmunológicas de los anticuerpos radiomarcados.

El kit liofilizado soporta una actividad de 50 mCi Tc 99m (MEC) en un volumen máximo de 5 mL, alcanzando una pureza radioquímica mayor del 95%, como ^{99m}Tc-Anti-CEA; la formulación reportada por Mather y Ellison ²¹ soporta 20 mCi en 1 mL, la descrita por ARCAL LII ²³ soporta valores similares de actividad y volumen de Tc 99m, comparables con los obtenidos en el presente trabajo.

Los resultados obtenidos en la distribución biológica en ratones sanos, permite evaluar el comportamiento “*in vivo*” del radioinmunoconjugado, ^{99m}Tc-Anti-CEA. Con los resultados obtenidos (% D.I / órgano), se puede apreciar que a las 4 horas hay una acumulación significativa de dosis inyectada en sangre (55,98%) debido a que la proteína radiomarcada se une a las células plasmáticas; este radioinmunoconjugado circulante se acumula en el hígado (14,90%) para luego depurarse por el sistema hepatobiliar y en menor porcentaje por riñones (3,82%). No se evidencia acumulación significativa en tiroides porque el tecnecio libre es menor del 3%.

Los valores obtenidos a las 4 horas, son comparables con los reportados por Koga ⁴⁵, Este investigador ha realizado estudios de biodistribución del IOR-CEA1 marcado con ¹³¹I en ratones sanos a las 4, 24, 48 y 96 horas post-inyección de este radioinmunoconjugado; el %D.I en sangre a las 4 horas es 59,54%, a las 24 horas 18,87%, a las 48 horas 6,90% y a las 96 horas 1,61%; el %D.I en hígado a las 4 horas es 18,52%, a las 24 horas 2,42 %, a las 48 horas 0,89% y a las 96 horas 0,21%; lo que evidencia que el anticuerpo radiomarcado es depurado del organismo vivo conforme transcurre el tiempo.

La fracción inmunoreactiva que se obtiene del ^{99m}Tc-anti-CEA frente a su antígeno CEA, es del $78,32 \pm 4,35$ %, valores aceptables comparados con la literatura que se encuentran entre 60 a 80% ^{23,26,46}. Otras literaturas mencionan, que es suficiente un porcentaje de reconocimiento inmunológico, Ac:Ag, entre 25 a 50% para fines de diagnóstico ²⁴. Se ha evidenciado la afinidad antígeno – anticuerpo.

Mardissian G. y Cols. ³² Plantearon que la principal causa de inestabilidad de las proteínas marcadas con Tc 99m era la transquelación del metal a la cisteína presente en sangre y tejidos. Por esta razón, los autores propusieron realizar desafíos o competencia contra excesos molares de este aminoácido para valorar la estabilidad de las moléculas marcadas con tecnecio 99m. Por su analogía química, esta prueba se ha aplicado también al ^{99m}Tc-Anti-CEA para valorar su estabilidad *in vitro*. Como se aprecia en la Tabla 11, se observa que la disociación o transquelación es menor del 10 %, como ^{99m}Tc-Cys, a las 4 horas de incubación a 37°C para una relación molar de 1:100 y 1:1000. A las 24 horas se observa que el porcentaje de transquelación es menor del 11% para una relación molar de 1:100 y menor del 16 % para una relación molar de 1:1000, valores aceptables comparados con la literatura ^{33,43}. La relación molar de 1:1000, es una condición extrema que garantiza que este radioinmunoconjugado puede ser usado potencialmente en los estudios clínicos.

Estudio de Estabilidad

De acuerdo a los estudios realizados a los cuatro lotes experimentales de Anti-CEA, almacenado por un periodo de 13 meses a una temperatura entre 2 a 8°C, al ser marcados con Tc 99m (MEC) conservan una pureza radioquímica mayor del 93 %. Además, el porcentaje de humedad promedio obtenido en los lotes experimentales mencionados son menores del 5%, valores que son considerados aceptables comparados con la literatura, que reportan menos del 5 % ^{41,42}. Por lo tanto la estabilidad del kit liofilizado es mucho mayor que el alcanzado por Castro y Ramírez (10 días, en solución a - 50°C) ³⁷ y por ARCAL LII (2 a 3 meses), liofilizado conservado entre 2 a 8°C) ²³. Asimismo, las características organolépticas no sufrieron cambios después del proceso de liofilización y posterior disolución del polvo liofilizado, manteniéndose la solución incolora y traslúcida.

El radioinmunoconjugado, ^{99m}Tc-Anti-CEA, es estable por 4 horas manteniendo una pureza radioquímica mayor del 90 % a temperatura de ambiente; la estabilidad del radioinmunoconjugado es comparable con el reportado por Castro y Ramírez ³⁷, ellos obtuvieron con el IOR-CEA1 y IOR-egf/r3 marcados con Tc 99m una estabilidad de 5 horas con una pureza radioquímica mayor del 90%.

Finalmente, los resultados logrados en este trabajo, permitieron desarrollar un kit liofilizado de Anti-CEA, con la siguiente composición cuantitativa: 1,2 mg Anti-CEA, 50 µg MDP, 5,95 µg SnF₂; para ser marcada con Tc 99m, radionucleido proveniente de un generador de extracción, con MEC, alcanzando una pureza radioquímica mayor del 95%, como ^{99m}Tc-Anti-CEA. El kit liofilizado es estable por 13 meses, pudiendo ser mayor el periodo mencionado como se puede apreciar en la Grafica 2; asimismo, el radioinmunoconjugado es estable por 4 horas. Además, mantiene sus propiedades biológicas e inmunoreactivas y es estable *in vivo e in vitro*.

V. CONCLUSIONES

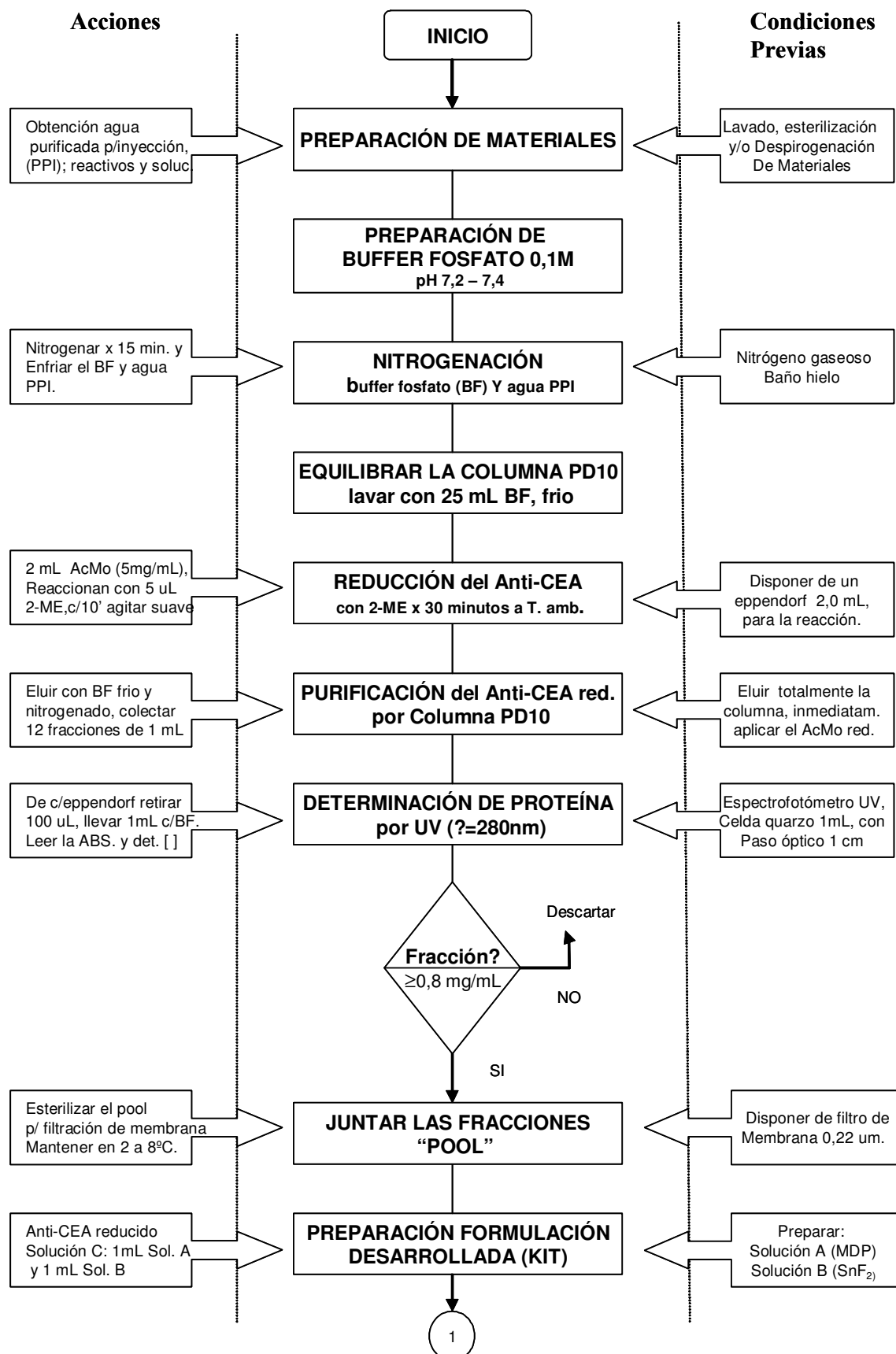
1. Se ha obtenido un kit liofilizado de Anti-CEA estable con la siguiente composición cuantitativa: 1,2 mg Anti-CEA, 50 μg MDP, 5.95 μg SnF_2 ; para ser marcado con el radionucleido Tc 99m, que se obtiene por extracción con metiletilcetona (MEC).
2. El kit liofilizado marcado por el método directo con el radionucleido, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Anti-CEA, alcanza una pureza radioquímica del $97,23 \pm 0,18\%$; las otras especies radioquímicas presentan los siguientes porcentajes: $2,80 \pm 0,22\%$ como $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ (tecnecio libre); $0,78 \pm 0,13 \%$ como $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$ (tecnecio reducido e hidrolizado) y $0,01 \pm 0,00\%$ como $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP. El pH de marcación se encuentra entre 7,0 a 7,5 y soporta una actividad de 50 mCi en un volumen máximo de 5 mL de solución de Tc 99m.
3. El comportamiento cinético del $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Anti-CEA a temperatura ambiente presenta a los 30 minutos post-marcación una pureza radioquímica mayor del 97% y a las 4 horas se mantiene por encima del 90%. Asimismo, las otras especies radioquímicas se mantienen por debajo del 10% en las primeras 4 horas post-marcación.
4. El comportamiento *in vivo* del radioinmunoconjugado, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Anti-CEA, a las 4 horas post-inyección, de dosis radiactivas en ratones sanos no se acumula en ningún órgano metabólico y sigue la farmacocinética de radiofármacos basados en proteínas, como alta captación en sangre, para luego ser depurado principalmente por vía hepatobiliar; las otras especies radioquímicas solubles son eliminadas por vía renal. Asimismo, no se manifestaron reacciones adversas en los animales de experimentación.

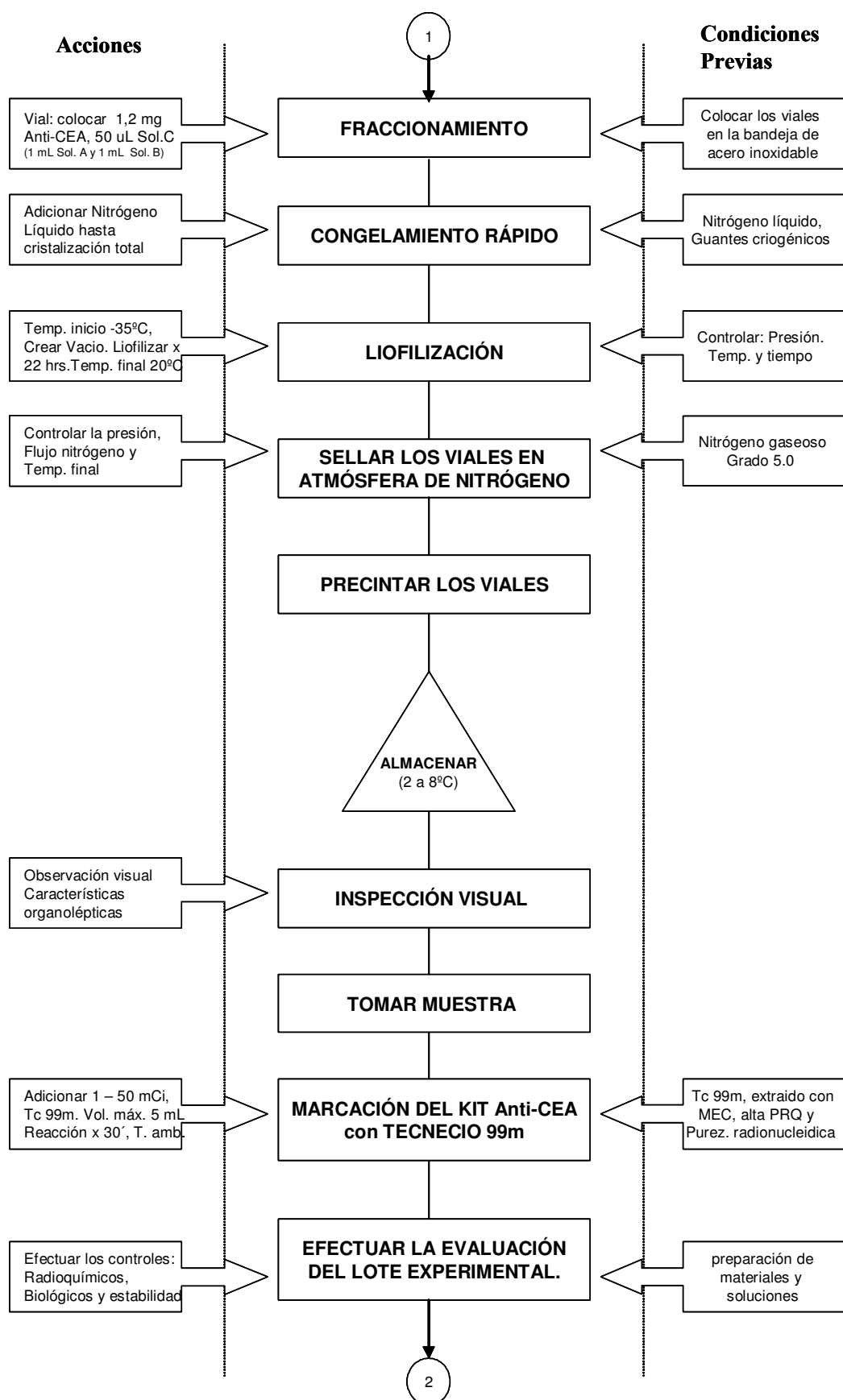
5. El radioinmunoconjugado, ^{99m}Tc -Anti-CEA, evidencia una alta estabilidad *in vitro*, en la prueba de desafío o competencia con L-cisteína se ha demostrado que para una relación molar de AcMo:Cys, 1:100, hubo una transquelación del 5,56% del total de la actividad del anticuerpo monoclonal a la L-cisteína; y para una relación molar de 1:1000 hay una transquelación del 7,05%; en las primeras 4 horas de incubación a 37°C. A las 24 horas el porcentaje de transquelación para ambas relaciones molares fue menor del 16%.
6. Con respecto a sus propiedades inmunológicas, el radioinmunoconjugado, ^{99m}Tc -Anti-CEA, mantiene su reconocimiento biológico frente a su antígeno Carcinoembrionario (CEA), en un 78% de unión específica de anticuerpo-antígeno.
7. El kit liofilizado presenta una estabilidad de 13 meses post-liofilización, refrigerado entre 2 a 8°C. Luego de ese tiempo, al ser marcado con Tc 99m aun se logra una pureza radioquímica mayor del 93% como ^{99m}Tc -Anti-CEA.
8. El proceso de liofilización fue optimizado, el ciclo tiene una duración de 22 horas con una temperatura inicial de congelación de -35°C por 4 horas, previa congelación con nitrógeno líquido; secado por 16 horas hasta alcanzar una temperatura final de 20 °C, donde se mantiene por 2 horas. El kit de Anti-CEA liofilizado según el programa de liofilización descrito presenta un porcentaje de humedad del $4,43 \pm 0,48$ %.
9. Los reactivos químicos utilizados en el desarrollo de la presente formulación, como el fluoruro estañoso anhidro y ácido metilén difosfónico, han sido los adecuados por no contener agua hidratada y otros excipientes, respectivamente; los mismos que han contribuido a garantizar la estabilidad del kit liofilizado.

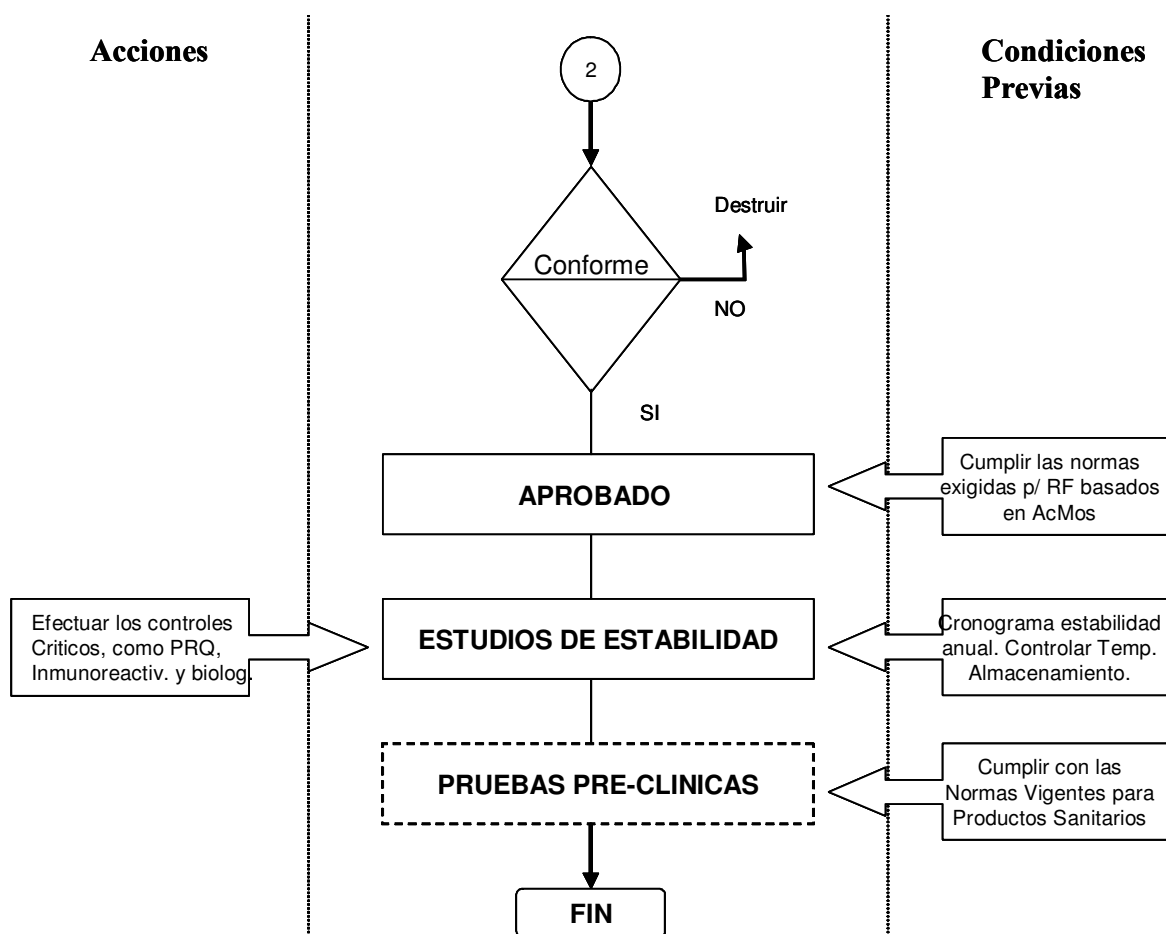
VI. RECOMENDACIONES

1. Con la formulación desarrollada en el presente trabajo, se recomienda producir un mínimo de tres lotes pilotos estériles y libres de pirógenos; para ser marcados con Tc 99m y posteriormente ser utilizados en los estudios preclínicos para el diagnóstico precoz y control de recidivas de cáncer colorectal.
2. Continuar optimizando el proceso de liofilización en la etapa de secado (primario y/o secundario) para obtener un kit liofilizado con un porcentaje de humedad entre 2 y 3%, para garantizar una estabilidad prolongada de por lo menos 2 años.
3. Continuar con los estudios de estabilidad del kit liofilizado para determinar la vida útil de este nuevo radiofármaco; hasta que mantenga una pureza radioquímica mayor del 90%, como ^{99m}Tc -Anti-CEA, almacenado entre 2 a 8°C. Asimismo, se deberá comprobar que conserve sus propiedades inmunoreactivas, al finalizar el mencionado estudio.
4. Completar los estudios de distribución biológica en animales sanos en función del tiempo de post-inyección: 4; 24 y 48 horas, con la finalidad de evaluar el comportamiento del radioinmunoconjugado, ^{99m}Tc -Anti-CEA, en el organismo vivo.
5. Realizar los controles microbiológicos en los lotes pilotos, que garanticen su calidad farmacéutica, para ser administrados en pacientes; como esterilidad y endotoxinas bacterianas, de acuerdo a la metodología reportada en la Farmacopea Americana vigente.
6. Marcar el kit liofilizado con Tc 99m, proveniente de un generador de adsorción $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$, para evaluar la pureza radioquímica y comparar con la obtenida en el presente trabajo.

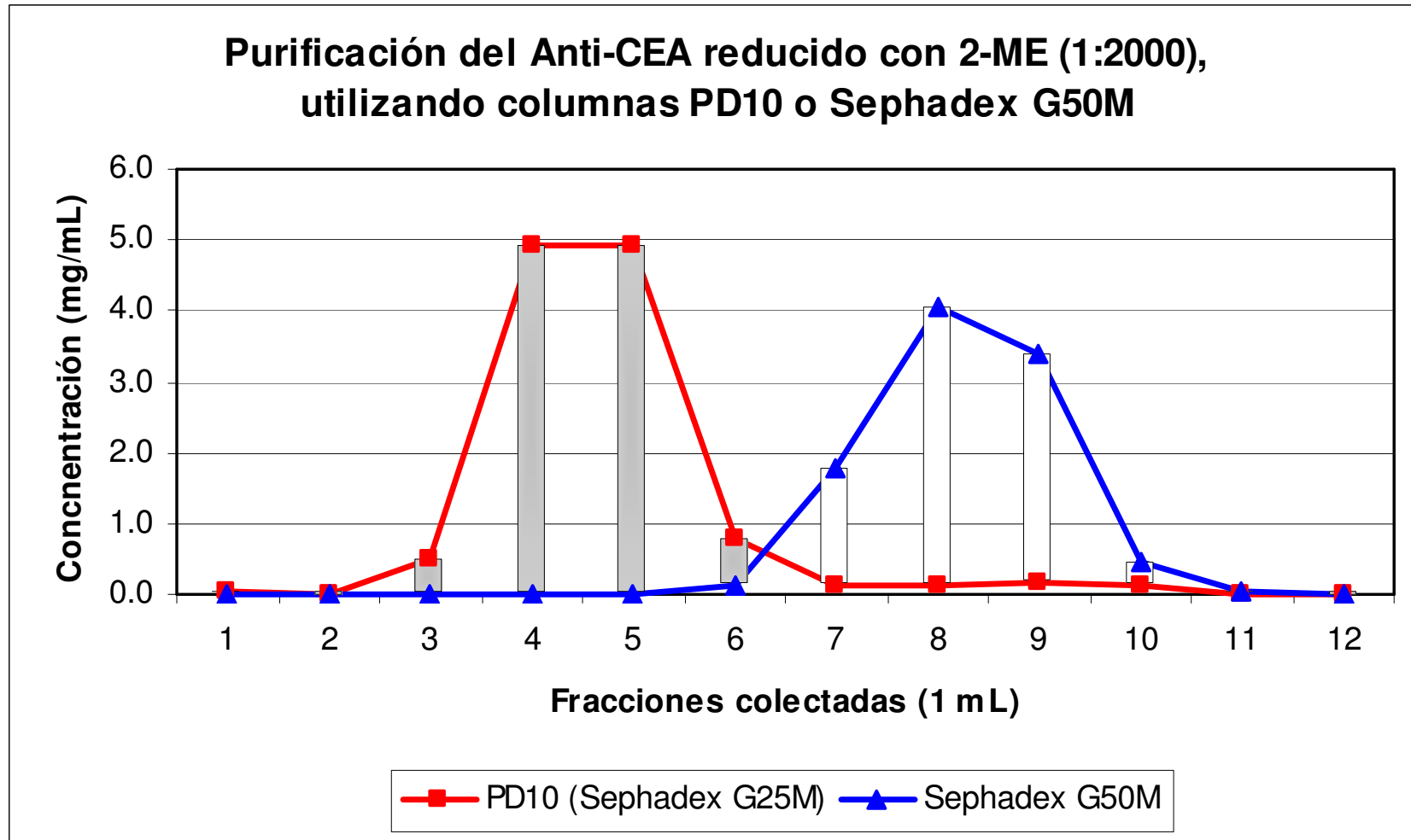
ANEXO N° 1: Flujograma del Desarrollo de un Kit Liofilizado de Anti-CEA, Para se Marcado con Tc 99m



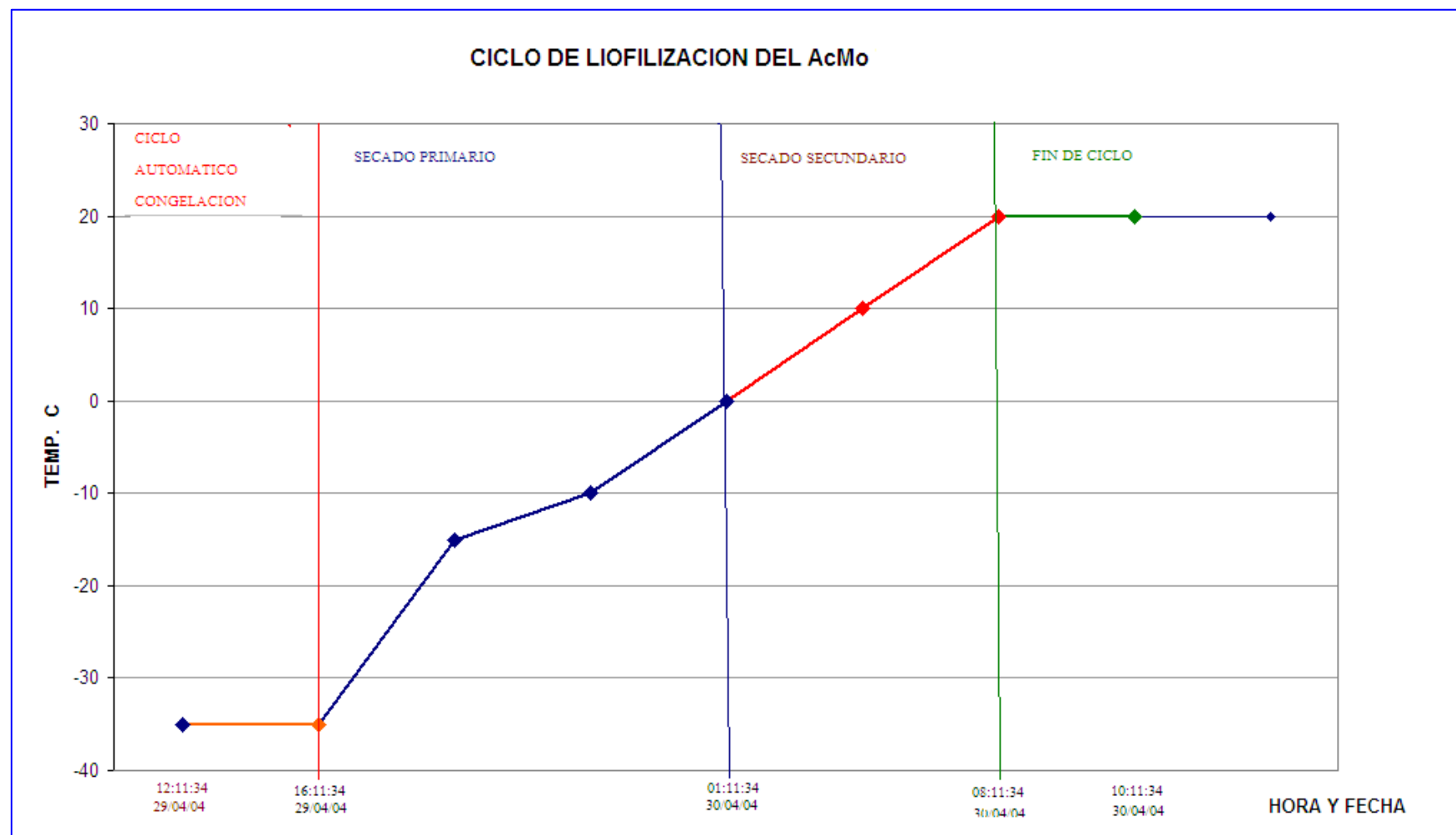




ANEXO N° 2: CURVA DE ELUCIÓN, PURIFICACIÓN DEL Anti-CEA reducido

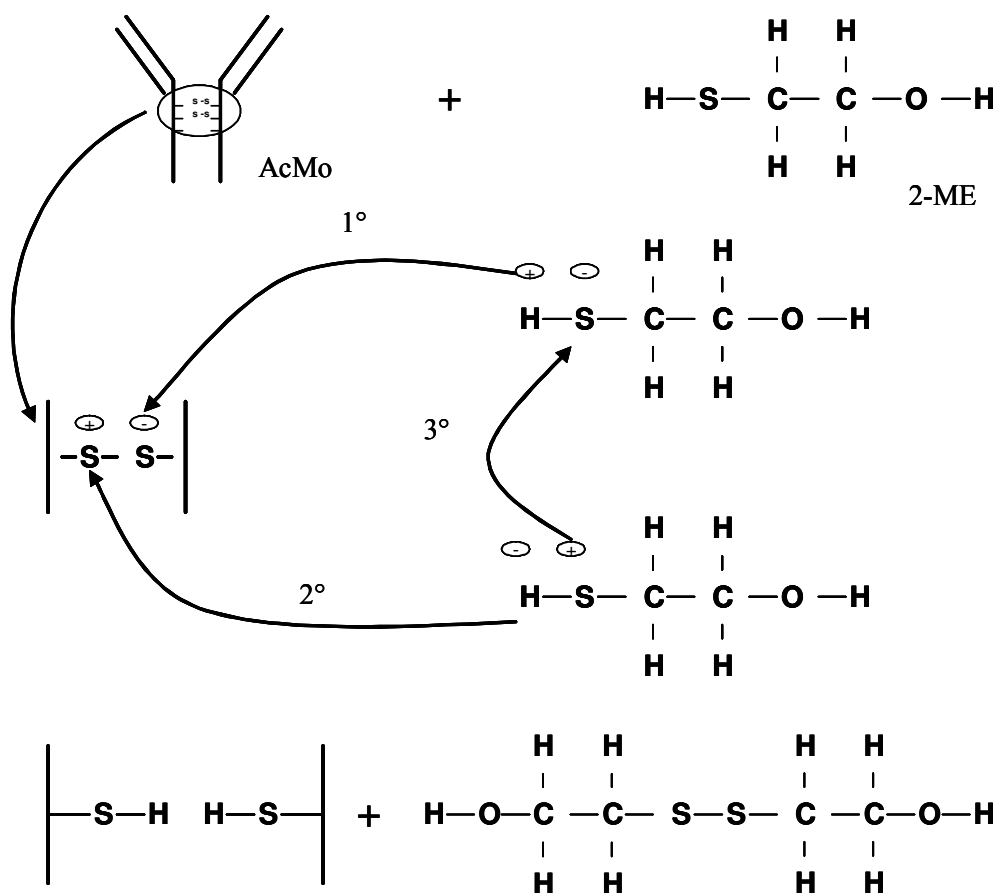


ANEXO N° 3. CICLO DE LIOFILIZACIÓN PARA EL Anti-CEA

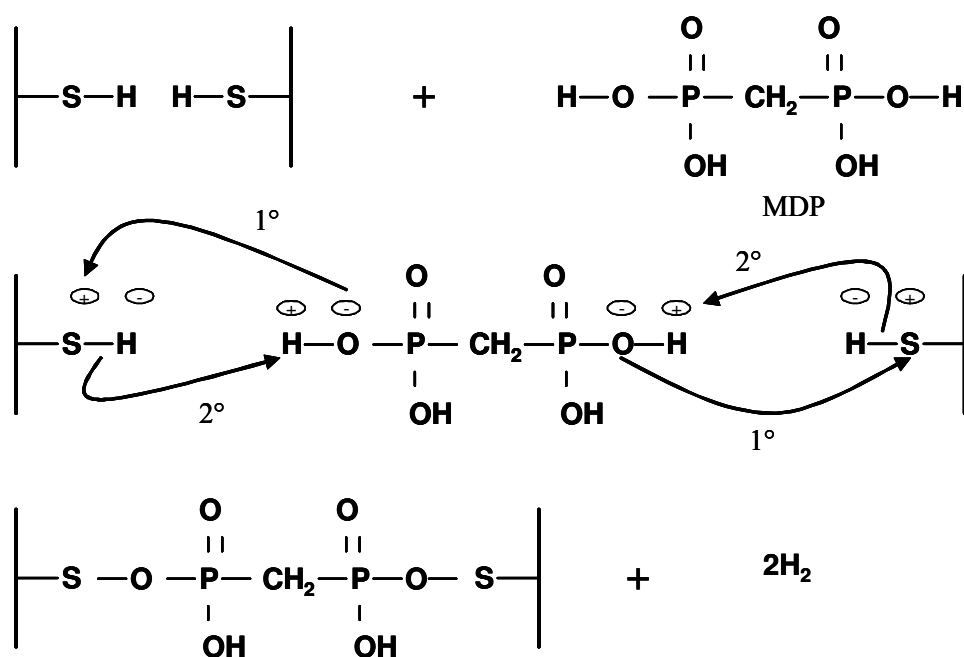


ANEXO N° 4: Mecanismo de Reacción Propuesto

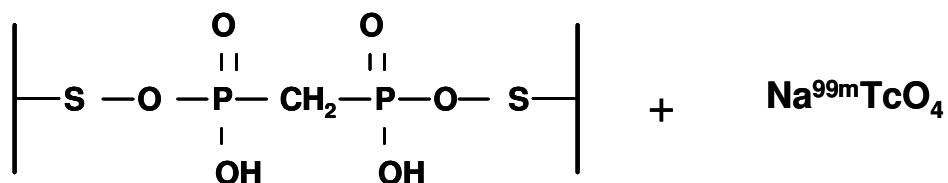
I. Reducción del anticuerpo monoclonal con 2-mercaptoetanol



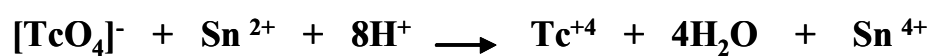
II. Formación del inmunocomplejo: AcMo - MDP



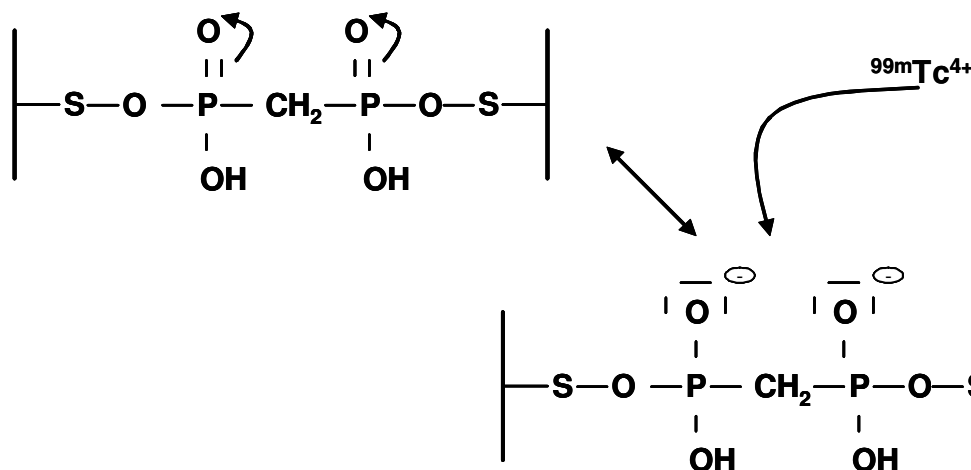
III. Síntesis o marcación del radioinmunoconjugado, ^{99m}Tc -MDP-AcMo



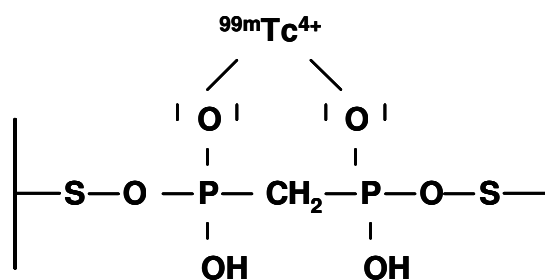
a) Reducción del ión pertecnetato con Sn II



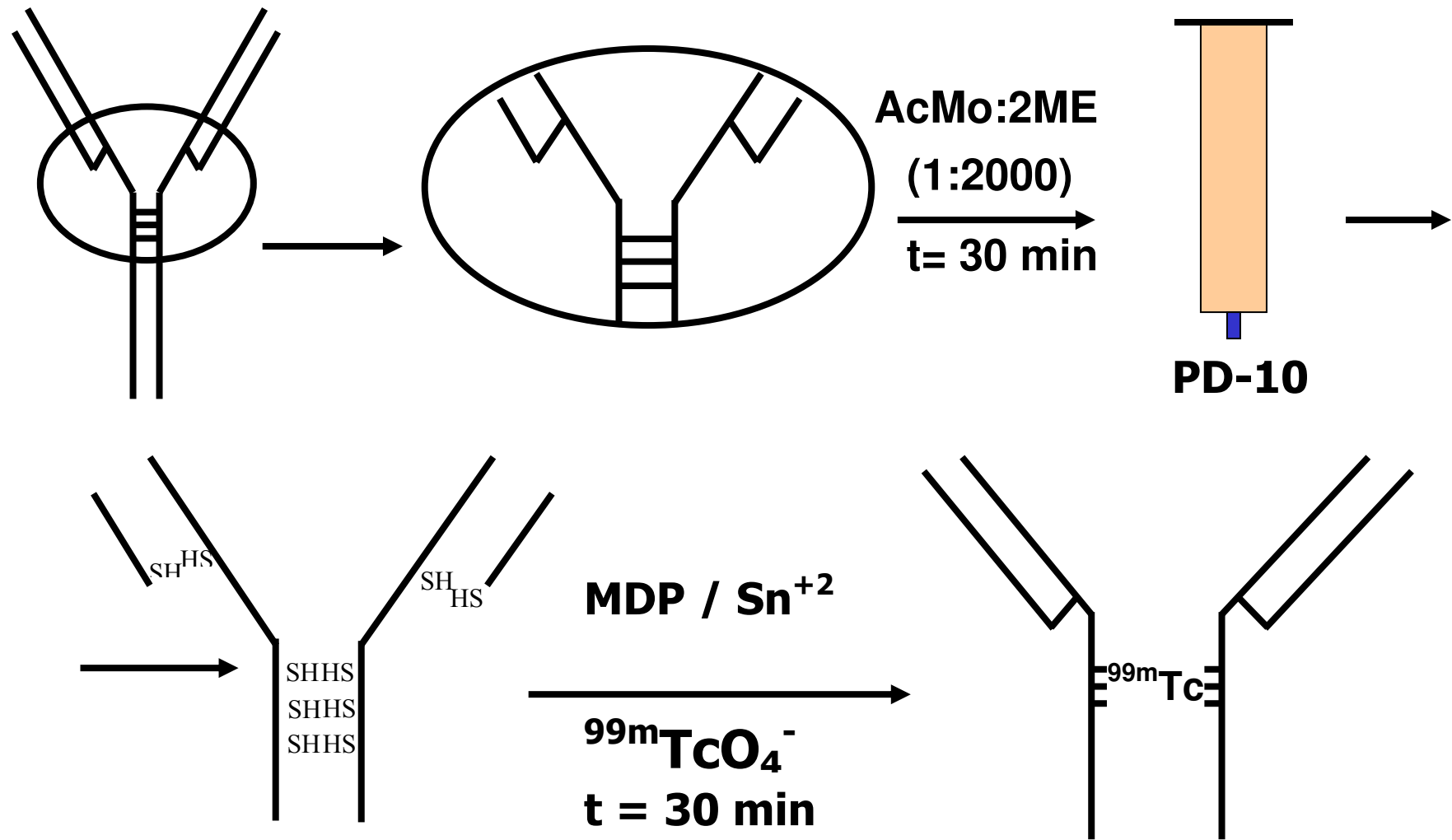
b) Incorporación del Tc reducido, al inmunocomplejo AcMo-MDP



c) Formación del radioinmunocomplejo, ^{99m}Tc -MDP-AcMo



ANEXO N° 5: MARCACIÓN DEL Anti-CEA POR EL MÉTODO DIRECTO CON Tc 99m



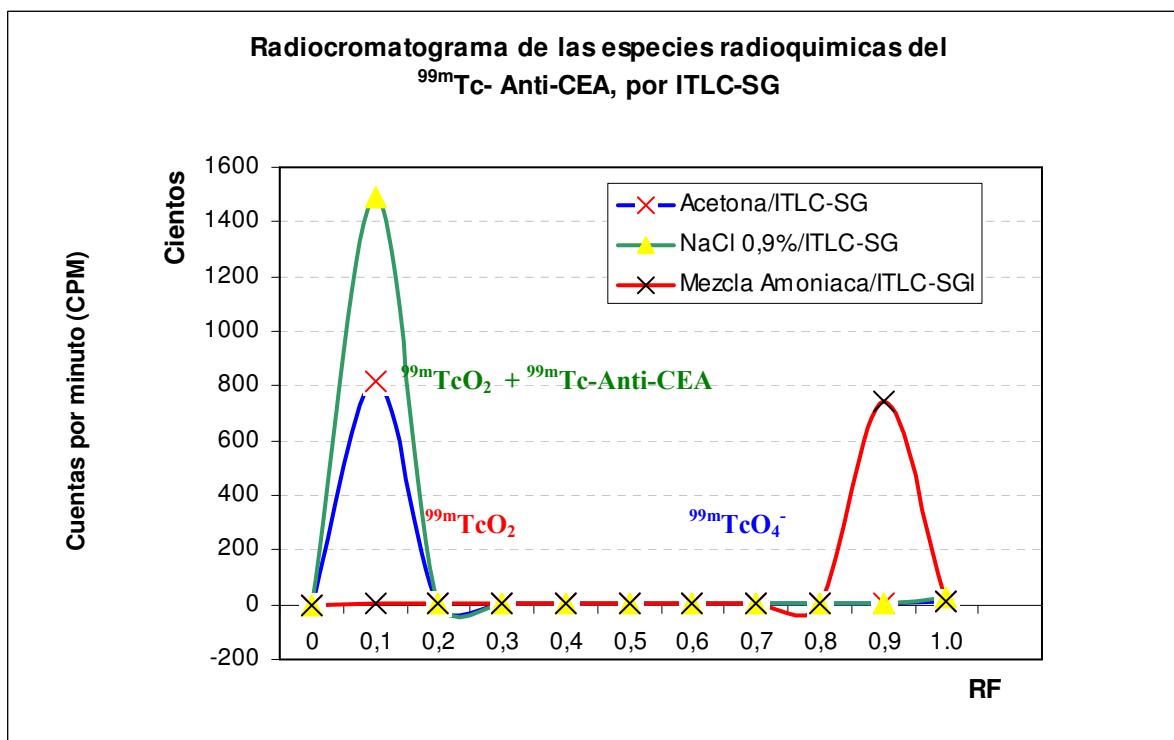
ANEXO N 6

Pureza Radioquímica del ^{99m}Tc -Anti-CEA, por ITLC-SG

^{99m} Tc-Anti-CEA				LOTE EXP. N 4		
MUESTRA:						
PH Marcacion:		7,0		Tiempo		
Actividad:		10 mCi		Rx:		30 minutos
Volumen:		1 mL		Soporte :		ITLC-SG
Rf	Acetona	%	NaCl 0,9%	%	Mez. Amoniactal	%
0.1	81717	96.80	148830	96.96	221	0.28
0.2	155	0.18	574	0.37	195	0.25
0.3	153	0.18	173	0.11	321	0.41
0.4	163	0.19	169	0.11	195	0.25
0.5	189	0.22	170	0.11	193	0.25
0.6	176	0.21	125	0.08	225	0.29
0.7	180	0.21	251	0.16	334	0.43
0.8	279	0.33	166	0.11	297	0.38
0.9	337	0.40	184	0.12	74653	95.83
1.0	1073	1.27	2848	1.86	1270	1.63
	84422	100.00	153490	100.00	77904	100.00

RESULTADOS:

% $^{99m}\text{TcO}_4^-$	1.67
% ^{99m}Tc -MDP	0.21
% $^{99m}\text{TcO}_2$	0.28
% ^{99m}Tc -Anti-CEA	97.84



ANEXO N° 7

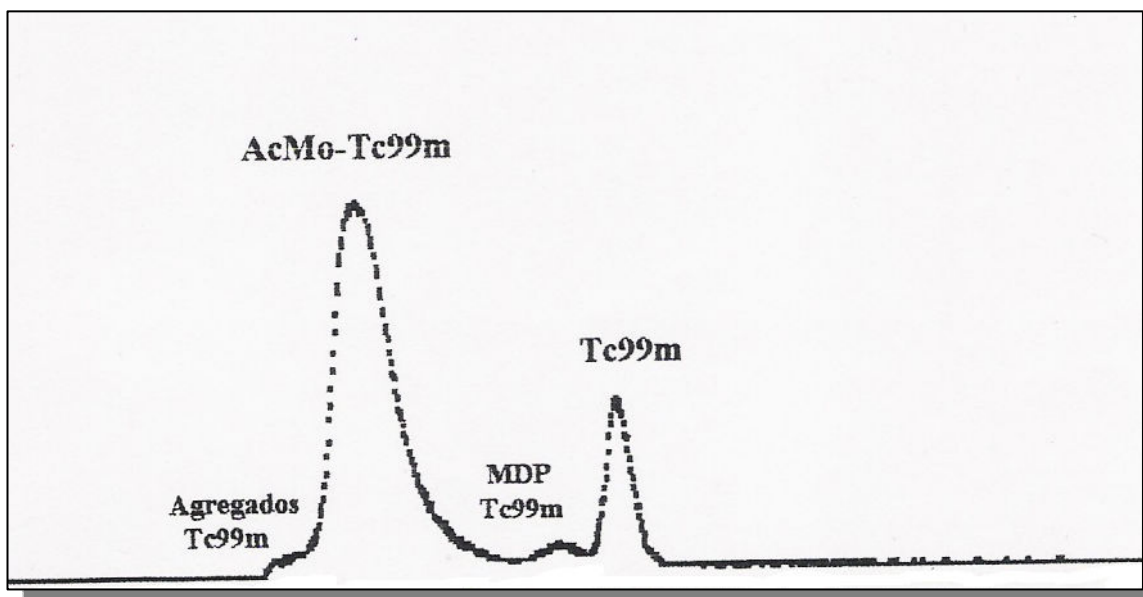
Pureza Radioquímica del ^{99m}Tc -Anti-CEA, por HPLC

MCA #1 – HPLC / Canberra S100 - AntiCEA.MCA - NBS mixed standard

Tag Number	:	117	Readout	Tue 10 Sep 2002 @ 12:06:35
Report Group	:	Full	Acquire Started:	Tue 10 Sep 2002 @ 15:40:25
Group Size	:	8192		
Elapsed Sweeps	:	1		
ADC	:	AMP/TSCA 2015 (64)		
Detector	:	Nal(Tl) 3 x 3		
Geometry	:	2PI (Pozo)		
Sample Description	:	Anti CEA-Tc 99m (Formulation N° 1)		
MCA Mode	:	MCSR+		
Preset Conditions	:	Sweeps = 1		
Calibration	:	8.645e-008*Ch ² + 0.4565*Ch + 10.75 KeV		
Area Statistics	:	Background Channels = 4		
		% Error Sigma = 1.65		
Results	:	% Radiochemical purity = 75.44		
		% Recuperation = 92.19		
Note	:	% Radiochemical purity by ITLC-SG = 74.41		

REGION OF INTEREST REPORT

ROI #	From(Ch) To (Ch)	Integral CPS	Area %Error	Peak(Ch) FWHM(Ch)	%
1	1823 2023	45106 0.00	4278 38.36	1876.97 0.57	0.22 agreg. Tc 99m
2	2080 3132	1935989 0.00	1593501 0.70	2419.00 355.14	83.25 AcMo Tc 99m
3	3405 3740	104312 0.00	18212 17.07	3566.76 100.33	0.95 MDP Tc99m
4	3784 4200	395698 0.00	298120 1.27	3956.08 146.78	15.57 Tc 99m



ANEXO N° 8

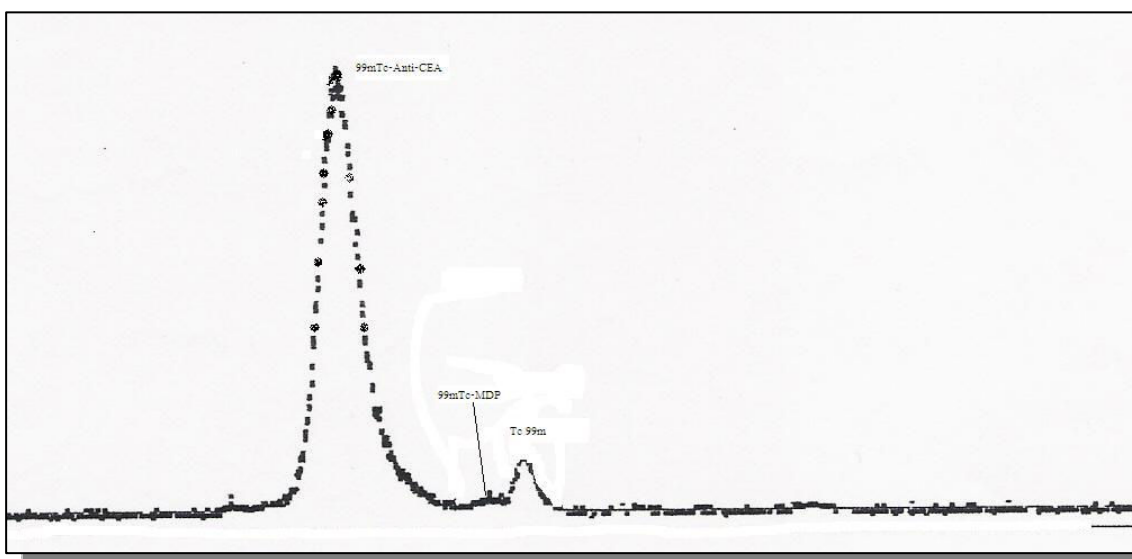
Pureza Radioquímica del ^{99m}Tc -Anti-CEA, por HPLC

MCA #1 – HPLC / Canberra S100 - AntiCEA.MCA - NBS mixed standard

Tag Number : 121 Readout: Fri 30 Apr 2004 @ 11:54:01
 Report Group : Full Acquire Started: Fri 30 Apr 2004 @ 17:26:25
 Group Size : 8192
 Elapsed Sweeps : 1
 ADC : AMP/TSCA 2015 (64)
 Detector : NaI(Tl) 3 x 3
 Geometry : 4 PI (Pozo)
 Sample Description : **Anti CEA-Tc 99m (Formulation N 4)**
 MCA Mode : MCSR+
 Preset Conditions : Sweeps = 1
 Calibration : $8.645\text{e-}008 \cdot \text{Ch}^2 + 0.4565 \cdot \text{Ch} + 10.75 \text{ KeV}$
 Area Statistics : Background Channels = 4
 % Error Sigma = 1.65
 Results : % Radiochemical purity = 97.49
 % Recuperation = 99.48
 Note : % Radiochemical purity by ITLC-SG = 97.33

REGION OF INTEREST REPORT

ROI #	From(Ch) To (Ch)	Integral CPS	Area %Error	Peak(Ch) FWHM(Ch)	%	
1	2055 2860	748433 0.00	563355 1.28	2355.07 292.33	98.07	AcMo Tc 99m
2	3201 3376	26511 0.00	1057 114.24	3362.44 1.60	0.18	MDP Tc99m
3	3541 3803	42249 0.00	10021 29.53	3604.33 31.34	1.74	Tc 99m



ANEXO N° 10

DISTRIBUCION BIOLÓGICA DEL ^{99m}Tc -Anti-CEA

FECHA DE CTRL. 30/04/2004

RADIOFARMACO
LOTE EXPERIMENTAL: ^{99m}Tc -AntiCEA
L-02
LIOFILIZADO

DATOS DEL PRODUCTO	
MARCACION	30/04/2004
HORA	8:35
ACTIVIDAD (mCi)	16,45
VOLUMEN (mL)	2,40
CONC. (mCi/mL)	6,85
pH.	7,00

PESO MOD.(g)	28,00
VOL. INY.(mL)*	0,10
HORA INY.	11:10
HORA SACRIF.	15:10

t' D.B. = 4 HORAS
ctrl - 1

MEDICIONES RADIATIVAS

1. LECT.STD. al 10% D.I	123948
2. LECT.STD. al 10% D.I	133100
3. LECT.STD. al 10% D.I	126190
4. LECT.STD. al 10% D.I	125700
PROMEDIO	127234,5

1.-LECT. BG	25
2.-LECT. BG	30
3.-LECT. BG	13
4.-LECT. BG	12
PROMEDIO	20

1% STD= 12566,29

ORGANOS	PESO(g.)	MED-RADIACT.	MEDIC-NETAS	% D.I./ORG	% D.I. / gORG
SANGRE	0,06	19166,00	19146,00		
HIGADO	1,54	172327,00	172307,00	13,71	8,90
BAZO	0,17	9275,00	9255,00	0,74	4,35
PULMONES	0,22	19454,00	19434,00	1,55	7,05
RIÑONES	0,43	43585,00	43565,00	3,47	8,07
ESTOMAGO	0,25	7990,00	7970,00	0,63	2,52
INTESTINOS	3,21	217439,00	217419,00	17,30	5,39
VEJIGA(ORINA)	0,16	31209,00	31189,00	2,48	15,50
CORAZON	0,11	12836,00	12816,00	1,02	9,27
MUSCULO	0,44	5849,00	5829,00	0,46	1,05
FEMUR	0,14	3218,00	3198,00	0,25	1,79
CARCAZA	17,25	677292,00	677272,00	53,90	3,12
TIROIDES	0,23	10507,00	10487,00	0,83	3,61
COLA	0,75	15536,00	15516,00	1,23	1,64
SANGRE TOTAL	1,96		625436,00	49,77	25,39
MASA MUSCULAR	12,04		159502,64	12,69	1,05
MASA OSEA	2,80		63960,00	5,09	1,82

OBSERVACIONES : Dilucion previa del ARD 1:3 con NaCl 0.9% antes de la inyeccion.

Pureza Radioquimica: 97.40%

Modelo biológico no presentó ningún tipo de reacción adversa al control realizado

Se consideró el factor de corrección para las mediciones radiactivas.

RESULTADO del DESARROLLO:

CONFORME

ANEXO N° 11: PROCESO DE PRODUCCIÓN DEL Tc 99m, POR EXTRACCIÓN CON MEC

Reactor RP10

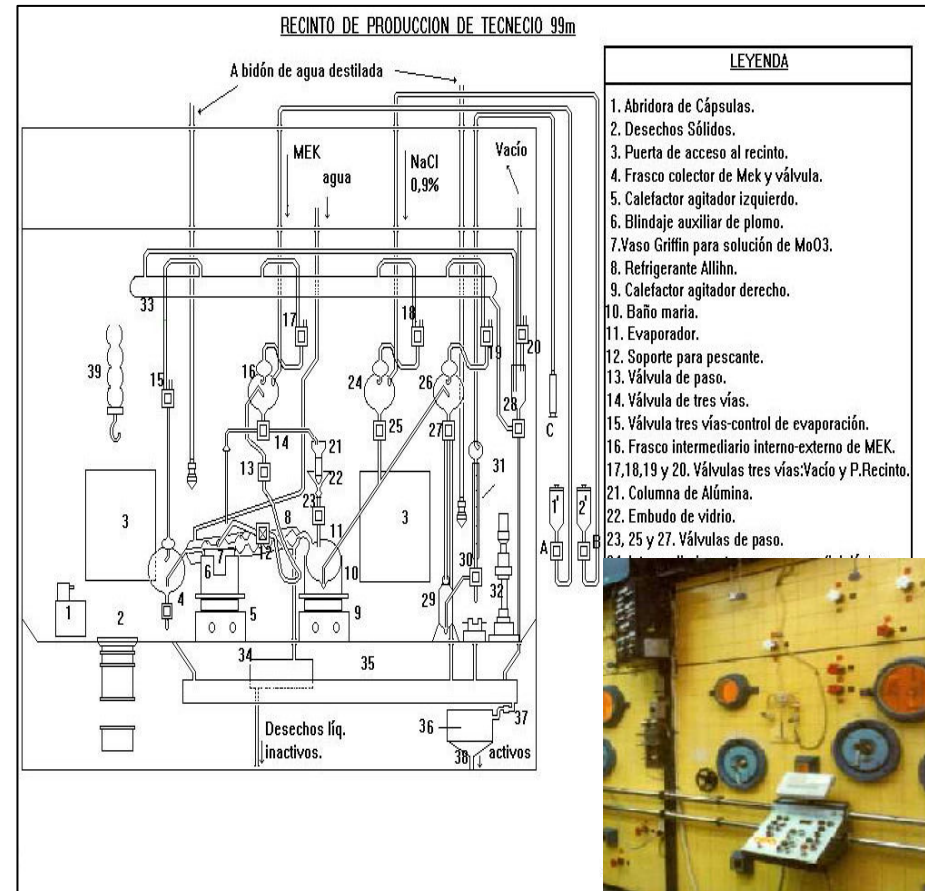
Blanco: MoO₃

Reacción Nuclear:



Planta de Producción de Radioisótopos

1. Disolución del blanco: $^{99}\text{MoO}_3 + \text{NaOH} \longrightarrow ^{99}\text{Mo}_2\text{MoO}_4 + \text{H}_2\text{O}$
2. Oxidación: $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (VII)
3. Extracción con MEC: $\text{MEC}-^{99\text{m}}\text{TcO}_4^{-1}$
4. Purificación por columna cromatográfica: $^{99}\text{Mo}/\text{Al}_2\text{O}_3$
5. Evaporación del MEC a presión reducida
6. Recuperación del $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^{-1}$
Con NaCl 0,9%: $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$
7. Esterilización
8. Control de Calidad (Cumplimiento USP)
9. Calibración
10. Embalaje y Despacho



ANEXO N° 12

Hoja Técnica del Pertecnetato de Sodio, Tc 99m

Código Fabricante – IPEN	RF 101
Producto	Pertecnetato de Sodio Tc 99m
Reacción Nuclear	$^{98}\text{Mo}(n, \gamma)^{99}\text{Mo}$
Método de Producción	Extracción con metiletilcetona (MEC)
Forma Farmacéutica	Solución inyectable endovenosa
Presentación	Vial de borosilicato empacado en contenedor de plomo
Periodo de Semidesintegración	6 horas
Fotopico gamma (intensidad)	140 keV (89%), gamma puro
Concentración radiactiva	10 –300 mCi / mL
Forma química	Pertecnetato de Sodio , $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$
Análisis	Especificaciones Técnicas
Características organolépticas	Solución acuosa, límpida, incolora e isotónica
Partículas extrañas	Ausencia de partículas extrañas
PH	6,0 a 7,0
Pureza Radioquímica	> 98%
Aluminio (+3)	< 5 ppm
Metiletilcetona (MEC)	< 0,1%
Agentes oxidantes	Exenta de agentes oxidantes
Esterilidad	Estéril
Endotoxinas Bacterianas	< 0,25 UE/mL
Identificación radionucleídica	Fotopico gamma de 140 keV
Pureza Radionucleídica	> 99,95 % de Tc 99m
Periodo de validez	Material radiactivo, perecible después de 2 periodos de semidesintegración.
Uso	Marcación de moléculas y biomoléculas utilizados en Gammagrafía
Almacenamiento	Temperatura ambiente

ANEXO N° 13

CARACTERÍSTICAS DEL ANTICUERPO MONOCLONAL, Anti-CEA

1. RESUMEN DEL PRODUCTO

Nombre Comercial:	IOR CEA1
Procedencia:	Centro de Inmunología Molecular, La Habana – Cuba
Composición:	Cada vial contiene 25 mg de anticuerpo monoclonal murino ior cea 1 estéril y apirogénico en solución tamponada (pH 6,5 – 7,5) de fosfato monobásico de sodio (2,55 mg), fosfato dibásico de sodio (9,00 mg), cloruro de sodio (43,00 mg) polisorbato 80 (1,00 mg) en agua para inyección. Concentración del monoclonal 5mg/mL.
Inmunogeno:	CEA
Parental/Fusión:	P3X63 Ag8. 653
Clon:	F6/IB2.D2
Clase/Subclase:	IgG1.
Punto isoeléctrico:	6,55 – 6,85
Peso Molecular:	180 kD
Inmunohistoquímica:	Muestra reactividad con el 100% de los adenocarcinomas de colon y un elevado por ciento de los adenocarcinomas de otras localizaciones estudiados.
Aplicaciones:	Localización y monitoreo inmunogammagráfico de adenocarcinomas.

2. INTRODUCCIÓN

El CEA se considera un antígeno tumor asociado de tejido derivado del ectodermo por su expresión en una variedad de neoplasia, especialmente aquellas del tracto gastrointestinal. El CEA, ha sido por ende extensivamente estudiado como posible indicador de la transformación maligna en la mucosa del colon.

El Centro de Inmunología Molecular ha desarrollado el ior cea1 un anticuerpo monoclonal altamente específico para la identificación del CEA, que en su forma terapéutica (ior cea1) es útil para el diagnóstico in vivo de adenocarcinomas colorectales y el monitoreo de sus metástasis y recidivas.

Anticuerpos monoclonales Anti-CEA para el diagnóstico in vivo han sido desarrollados también por otras firmas comerciales (IMACIS-1, CIS Biointernational, BW 431126).

3. CEA. ANTÍGENO

El antígeno carcinoembrionario (CEA) ha sido uno de los marcadores tumorales mas ampliamente investigado desde su aislamiento del intestino fetal humano y tejidos de cáncer de colon adulto por Gold y Freedman en 1965. Actualmente se define como una familia de isoantígenos compuesta por glicoproteínas de 120 - 300 kD con una relación carbohidratos proteína de aproximadamente 2:5.

4. ior cea1. ANTÍCUERPO

El ior cea1 es un anticuerpo monoclonal (AcMo) del tipo IgG1 secretado por el hibridoma F6/IB2-D2 obtenido de la fusión del mieloma de ratón P3/X63 Ag8 653 con los linfocitos del bazo de ratones Balb-c inmunizados con CEA purificado a partir de metástasis hepáticas de adenocarcinomas del colon humano.

El AcMo esta incluido en el grupo GOLD 1 de acuerdo a la clasificación de Hedin, lo cual lo hace altamente específico para la identificación del CEA.

5. ESTUDIOS CLÍNICOS

El AcMo ior cea1 ha sido evaluado en investigaciones preclínicas según los requisitos establecidos OMS, para iniciar el ensayo diagnóstico en pacientes con cáncer colorectal. El ior cea1 mostró reactividad con todas las muestras estudiadas de tejido de pacientes con adenocarcinomas del colon. Reacciona además con colon fetal, mucosa normal del colon y diferentes tumores del tracto digestivo, así como, adenocarcinomas de mama y pulmón. No reconoció otros órganos normales.

6. TOXICIDAD

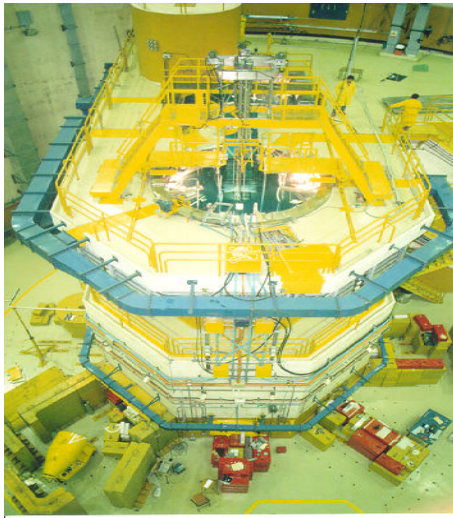
Se ha realizado la evaluación de la toxicidad del anticuerpo monoclonal ior ceal en forma de administración aguda endovenosa en dosis de hasta 25 veces la dosis propuesta para la administración al hombre en dosis únicas, se ha evidenciado la ausencia de manifestaciones de toxicidad en ratas Sprague Dawley de ambos sexos. Además, no se observaron alteraciones e el incremento de peso corporal ni en el comportamiento de los animales en un periodo de observación de un mes posterior a la administración de las dosis.

**ANEXO N° 14: FOTOS DE LOS
LABORATORIOS,
MATERIALES Y
EQUIPOS UTILIZADOS**

FOTO N° 1: CENTRO NUCLEAR “RACSO” – IPEN

REACTOR RP10

Es un reactor tipo piscina de 10 MW de potencia térmica, posee un núcleo constituido por elementos combustibles tipo MTR de uranio 235 enriquecido al 20%. En este reactor se irradia el trióxido de molibdeno para producir el molibdeno 99, que posteriormente decae por emisión beta a Tc 99m (87%) y Tc 99 (13%).



PLANTA DE PRODUCCIÓN DE RADIOISÓTOPOS

Es una instalación que tiene una infraestructura moderna que dispone de laboratorios diseñados para producir y desarrollar nuevos radiofármacos. En el recinto de la derecha se ingresa el trióxido de molibdeno irradiado, el cual es disuelto en medio básico y por extracción con MEC se separa el Tc 99m del Mo 99.



FOTO N° 2. REDUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ANTI-CEA



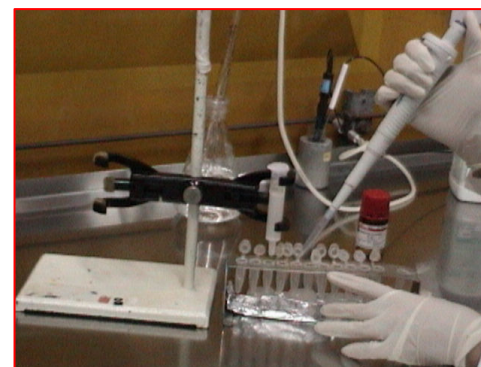
1. Materiales



2. La proteína reducida es purificada por columna PD 10



3. La proteína purificada es colectada en fracciones de 1 mL (12 fracciones).



4. Retirar 100 uL de cada fracción, llevar a 1mL con BF 0,1 M; leer 280 nm.

FOTO N° 3. AREA LIMPIA: FRACCIONAMIENTO Y LIOFILIZACIÓN



1. La formulación es fraccionada en viales de borosilicato tipo I



2. Los viales conteniendo la formulación son congelados rápidamente con nitrógeno líquido

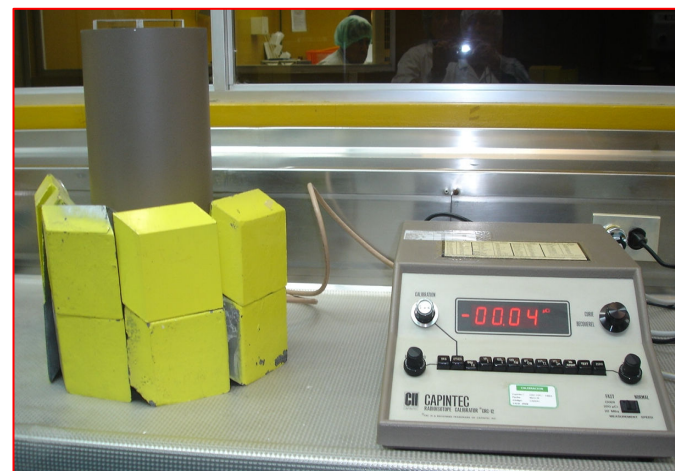


3. Los viales pre- congelados son llevados al liofilizador, para iniciar el ciclo de liofilización

FOTO N° 4. EQUIPOS UTILIZADOS EN LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA Y CALIBRACIÓN



1. Espectrofotómetro UV marca HITACHI,
modelo U-2000

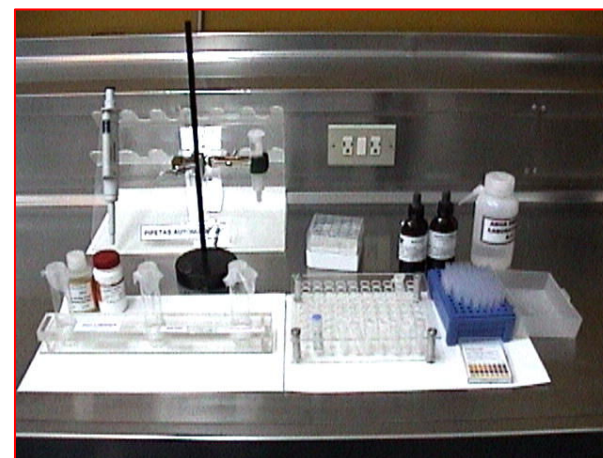


2. Calibrador de dosis Marca CAPINTEC,
modelo CRC 12

FOTO N° 5. REACTIVOS Y MATERIALES UTILIZADOS PARA LA MARCACIÓN Y EVALUACIÓN RADIOQUÍMICA



1. Celda radioquímica, utilizada en la marcación del kit Anti-CEA con Tc 99m

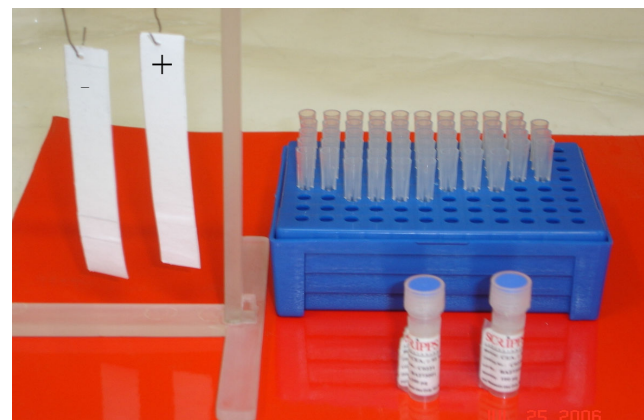


2. Reactivos y materiales, utilizados en la evaluación radioquímica del ^{99m}Tc -Anti-CEA

FOTO N° 6. EVALUACIÓN RADIOQUÍMICA e INMUNOREACTIVIDAD DEL ^{99m}Tc -Anti-CEA



1. Control radioquímico por cromatografía instantánea en capa delgada, ITLC-SG

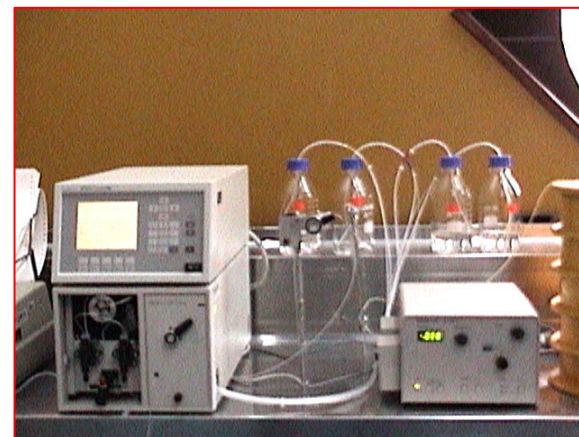


2. Prueba de inmunoreactividad frente al antígeno CEA, por cromatografía de afinidad.

FOTO N°7. EQUIPOS UTILIZADOS PARA LA EVALUACIÓN RADIOQUÍMICA DEL ^{99m}Tc -Anti-CEA



1. Contador Gamma marca WIZARD WALLAC modelo 1420, utilizado para ITLC-SG



2. HPLC marca WATERS, detector radiométrico de INa (Tl) tipo pozo 3x3”.

FOTO N° 8. DISTRIBUCIÓN BIOLÓGICA DEL ^{99m}Tc -Anti-CEA, EN RATONES SANOS



1. El ^{99m}Tc -Anti-CEA es inyectado en la vena caudal de un ratón sano.

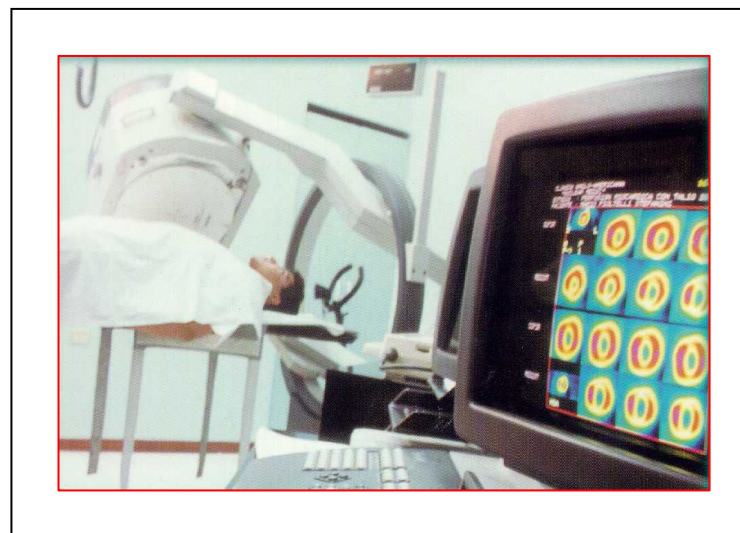


2. Luego de sacrificar al ratón, los órganos son extraídos y colocados en tubos de igual geometría



3. Cada tubo es medido en una cadena de espectrometría gamma monocanal prefiada para Tc 99m

FOTO N° 9. EQUIPO SPECT, UTILIZADO PARA ADQUISICIÓN DE IMAGENES EN EL PAIS



CENTRO DE MEDICINA NUCLEAR - INSTITUTO PERUANO DE ENERGÍA NUCLEAR
INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS

ANEXO N° 15: GLOSARIO

Actividad. - Número de transformaciones nucleares producidas por una cantidad de material radioactivo en la unidad de tiempo. El término es usado frecuentemente en lugar de radiactividad. La unidad de actividad es el curie, reemplazado por el Becquerel en la actualidad. Se calcula con la fórmula $A = A_0 \cdot e^{-\lambda t}$

Actividad específica. - Se define como la radioactividad por unidad de masa del radionucleido o de la forma química presente (MBq/mg, mCi/mg). La actividad específica de una muestra de radionucleido libre de portador esta relacionada con su periodo de semidesintegración.

Afinidad. - Es el poder intrínseco del sitio activo de un anticuerpo para unirse con un solo determinante antigénico.

Anticuerpo (Ac). - o Inmunoglobulina, es una molécula específica de naturaleza glicoproteica sintetizada por los linfocitos B, modificados en plasmocitos, capaz de unirse de forma extremadamente selectiva a otra, un antígeno. Con ese acoplamiento se pueden conseguir múltiples aplicaciones clínicas, dependiendo de la naturaleza y efectos de ese antígeno específico.

Antígenos (Ag). - Constituyen elementos capaces de combinarse específicamente con un anticuerpo, pudiendo o no desencadenar una respuesta inmune, solo aquellos que levantan una respuesta inmune ya sean del tipo humoral, celular o de ambas se les conoce como inmunógeno.

Adsorción. - Retención, adherencia o concentración en la superficie de un sólido.

Becquerel. - Símbolo Bq. Unidad de actividad del sistema internacional de unidades (SI). Equivalente a una desintegración nuclear por segundo.

Calibración. - Evaluación de la actividad de una fuente o muestra radiactiva, mediante la comparación con un patrón establecido.

Calibrador. - Dispositivo electrónico que permite determinar la actividad de una fuente o muestra radiactiva.

Cámara de ionización. - Cámara de gas que opera entre un mínimo voltaje que sea suficiente para que se recojan en el ánodo todos los electrones primarios que produce la radiación al actuar sobre el gas y el voltaje máximo para que ninguno de los iones primarios, en su viaje hacia los electrodos, vaya a causar ionización del gas.

Carcinomas. - cánceres o neoplasias malignas que se originan en los tejidos de revestimiento de nuestro organismo: piel o mucosas, órganos reproductores, etc.

Curie. - Símbolo Ci. Unidad de radiactividad y que equivalen a $3,7 \times 10^{10}$ desintegraciones nucleares por segundo. 1 milicurie (mCi) = 10^{-3} Ci

Concentración radiactiva. - Relación de actividad del radionucleido sobre el volumen de la solución en que se encuentra disuelto, obtenido por medición de la actividad en cámara de ionización entre el volumen de la solución. Por ejemplo, milicuries por mililitro (mCi/mL) Megabequerelio por mililitro (MBq/mL).

Determinante antigénico. - es el conjunto de áreas restringidas de la molécula antigénica que permite unirse a los sitios activos del anticuerpo. El número de determinantes antigénicos o epítopes se conoce como la valencia de un antígeno en particular.

Detector radiométrico. - Cualquier dispositivo que permite poner de manifiesto la presencia de radiaciones.

Dosis. - Es la medida de la radiación recibida o absorbida por un blanco.

Estado metaestable. - es un estado nuclear inestable con vida media finita y medible que decae por emisión gamma sin cambio en el número atómico. Su abreviatura es la letra m Ejemplo: Tc 99m

Energía nuclear. - Energía liberada por la fisión atómica en los reactores.

Gammagrafía. - Método visual en el cual, mediante un detector fijo o móvil, se registra la distribución de un trazador radiactivo en un órgano o tejido, produciendo una imagen funcional.

Generador. - Sistema que incorpora un radionucleido, que en su desintegración origina otro radionucleido, que se utilizará como parte integrante de un radiofármaco.

Isótopo.- Átomos que tienen el mismo número atómico, y por tanto, las mismas propiedades químicas aunque tienen distinta masa atómica; es decir, tienen distinto número de neutrones en el núcleo.

Kit. - Def.1, Juego de reactivo que contiene una formulación en solución o liofilizada que debe combinarse con el radionucleido para obtener finalmente un radiofármaco. Def.2, Preparado químico liofilizado, suspensión o en solución, estéril y libre de endotoxinas bacterianas, listo para combinar con un radionucleido para obtener un radiofármaco.

Liofilización. - Es el proceso de deshidratación por sublimación a muy baja presión de una solución, suspensión o coloide, generalmente acuoso, previamente congelado. Las bajas temperaturas en las que se efectúa el proceso inhiben las reacciones bioquímicas, bacterianas y enzimáticas, permitiendo bloquear desde un principio estos procesos biológicos de degradación.

Medicina Nuclear. - Especialidad médica que versa sobre el uso de los radionucleidos, incorporándolos o relacionándolos, “*in vivo*” o “*in vitro*”, con alguna función orgánica, con fines de diagnóstico, terapéuticos o de investigación.

Metaestable. - Estado en el que un radionucleido excitado permanece durante el tiempo suficiente como para ser directamente observado.

Periodo de Semidesintegración. - Es el intervalo de tiempo necesario para que un radionucleido determinado reduzca su actividad a la mitad.

Proceso de liofilización. - Congelamiento, Sublimación y desorción. Se obtiene un producto seco o puro, con sus propiedades físicas, químicas y biológicas inalterables; desaparecen los riesgos de alteración cuando se mantienen en solución o suspensión, por presencia de agua (hidrólisis, acción de la luz, acción catalítica, enzimática, de oxidación, bacteriana) y el producto final es muy liviano y viable de almacenar por periodos largos.

Pureza Radionucleidica. - Porcentaje del radioisótopo deseado sobre otros radioisótopos contaminantes determinados por espectrometría gamma.

Pureza Radioquímica. - Fracción del radionucleido presente en la forma química deseada presente en el radiofármaco y determinada por métodos cromatográficos y/o electroforéticos.

Radioinmunoconjugado. - Biomolécula producida por el sistema inmunológico de los seres vivos que ha sido unido a un radionucleido.

Radiofármaco. - Medicamento especial que contiene un radionucleido en su composición y se utiliza en seres humanos con fines de diagnóstico y tratamiento de enfermedades.

Sitio Activo. - Región restringida de la molécula de anticuerpo que reacciona específicamente con uno de los determinantes del antígeno.

SPECT (Single photon emission computed tomography). - Es un Tomógrafo computarizado de la sola emisión del fotón, es una técnica tomográfica de proyección de imagen de la medicina nuclear, usando rayos gama. Es muy similar a la proyección de imagen planar de la medicina nuclear convencional usando una cámara fotográfica gamma. Sin embargo, puede proporcionar la información verdadera 3D. Esta información se presenta típicamente como rebanadas seccionadas transversalmente a través del paciente, pero se puede cambiar formato o manipular libremente como sea necesario

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. KOHNLEIN, W., GARNET, M.C., "Drug Targeting: Immuno Conjugates for Cancer Therapy", Proposal for a Concertad Action on Drug Targeting: Immuno Conjugates for Cancer Therapy, Munster (1989).
2. BIE, S.H., FERREIRA, T.C., PAUWELS, E.K.J., et al., Immunoscintigraphy for cancer detection: " A thousand ills require a thousand cures", J. Cancer Res. Clin. Oncol. 118 (1992) 1 – 15.
3. PRESSMAN, D., FORNGOLD L. The in vivo localization of anti-Wagner osteogenic sarcoma antibodies, Cancer 6 (1953) 619-23.
4. GOLDENBERG,D.M., DELAND, F., KIM, E., et al., Use of radio labelled antibodies to carcinoembryonic antigen for the detection and localization of diverse cancers by external photoscanning, N. Engl. J. Med. 298 (1978) 1384-8.
5. KOHLER, G., MILSTEIN, C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, Nature 256 (1975) 495-7.
6. MACH, J.P., BUCHEGGES, F., FORNI, M., et al., Use of radiolabelled monoclonal anti-CEA antibodies for the detection of human carcinomas by external photoscanning of tomoscintigraphy, Immunol. Today 2 (1981) 239 – 49.
7. BAUM, R.P., LORENZ, M., SENKOWITZ, R., et al., "Clinical experience in cancer diagnosis with radiolabelled monoclonal antibodies in 200 patients and initial attempts at radioimmunotherapy", Srivastara Sc. Radiolabelled Monoclonal Antibodies for Imaging and Therapy, Plenum Publishing Corporation (1988) 613-51.

8. KEENAN, A.M., HERBERT, J.C., LARSON, S.M., Monoclonal antibodies in nuclear medicine, J. Nucl. Med. 26 (1985) 531-7.
9. ARTEAGA DE MURPHY C., El Tecnecio en la Medicina Nuclear. Sociedad Mexicana de Medicina Nuclear, México D.F. (1989) 277-8, 288-90, 301-04.
10. PIMENTEL, G., Marcaje de anticuerpos monoclonales y control de calidad. Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología, Cuba. (2002).
11. WATERS, S.L., SILVESTRE, D.J., Inorganic Cyclotron Radionuclides, Radiochim. Acta 34 (1982) 25-40.
12. RHODES, B.A., BURCHIEL, S.W., Radiolabeling of antibodies with technetium 99m, (1983).
13. HNATOWICH, D.J., RUSCKOWSKI, M., FRITZ, B., Localization of infection using streptavidina and biotin: An alternative to nonspecific policlonal immunoglobulin, J. Nucl. Med 33 (1992) 1810 – 15.
14. BHARGAVA, K.K., ACHARYA, S.A., Labeling of monoclonal antibodies with radionuclides, Seminars in Nuclear medicine 19 (1989) 187 – 201.
15. HNATOWICH, D.J., MARDIROSSIAN, G., RUSCKOWSKI, M., et al., Directly and indirectly technetium 99m-labelled antibodies. A comparison of in vitro and animal in vivo properties, J. Nucl. Med. 34 (1993) 109 – 119.
16. SCHWARZ, A., STEINSTRASSER, A., A novel approach to Tc 99m labeled monoclonal antibodies, J. Nucl. Med. 28 (1987) 721.
17. OLIVA, J.P., PIMENTEL, G., PERALTA, P., et al., Inmunocentelleografía del cáncer colorectal empleando el AcMo BW431/26 anti-CEA-Tc 99m. Primeros resultados clínicos. Rev. Esp. Med. Nucl. 14 (1995) 207-212.

18. OLIVA, J.P., PERALTA, P., PIMENTEL G., CASSOLA, J., et. Al., IOR-CEA1: un nuevo anticuerpo monoclonal anti-CEA ^{99m}Tc para la inmunogammagrafía de los tumores colorrectales. Resultados preliminares. Rev. Esp. Med. Nuclear 13 (1994) 7-13.
19. GRIFFITHS, G.L., GOLDENBERG, D.M., JONES, A.L., AND HANSEN, H.J., Radiolabeling of monoclonal antibodies and fragments technetium and Rhenium. In: Perspectivas in Bioconjugate Chemistry. American Chemical Society, Washington, DC, (1993)160-168.
20. PIMENTEL, G., OLIVA, J.P., SÁNCHEZ, I. Anticuerpo monoclonal ior-CEA1: comparación de dos métodos de marcaje con ^{99m}Tc , Rev. Esp. Med. Nuclear 15 (1996) 143-148.
21. MATHER, J.S., ELLISON, D., Reduction-Mediated technetium- 99m labelling of monoclonal antibodies, J. Nucl. Med. 31 (1990) 692-697.
22. ARCAL LII - OIEA, "Preparación, control de calidad y validación de radiofármacos de ^{99m}Tc basados en anticuerpos monoclonales", Panamá, (2003).
23. ARCAL LII - OIEA, "Curso regional de capacitación sobre preparación y control de calidad de radiofármacos para inmunocentelleografía basados en anticuerpos monoclonales", Lima-Perú, (2002).
24. LIDMO, T., BOVEN, E., CUTTITA, F., et al., Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at onfinite antigen exceso, J. Imm. Method. 72 (1984) 77-89.
25. HANDBOOK OF RADIOPHARMACEUTICAL QUALITY CONTROL, ALASBIMN (1986) 13-24.

26. FERRO-FLORES, G., LEZAMA-CARRASCO, J., “A freeze Dried kit formulation for the preparation of ^{99m}Tc -EHDP-MoAb-IOR-CEA1 Complex”, Nucl. Med. Biol. 7 (1994) 1013-1016.
27. ARCAL XV – OIEA, “Manuel de Protocolos de Control de Calidad de Radiofármacos”, (1999).
28. ROBLES, A., “Producción y Control de Calidad de Radiofármacos y Radioisótopos, Trabajo Monográfico, Facultad de Química e Ing. Química – Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú, (1997).
29. RHODES, B.A., BURCHIEL, S.W., Radiolabeling of antibodies with technetium 99m . In: Burchiel SW, Rhodes AB, editors. Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy. New Cork: Elsevier (1983) 207-222.
30. NOROÑA O.P.D., In house Production and control of a few ^{99m}Tc -Radiopharmaceuticals, Appl. Radiat. Isot. 37 (1986) 1150-1154.
31. RHODES, A.B., Direct labeling of proteins with ^{99m}Tc , Nucl. Med. Biol. 18 (1991) 667-676.
32. MARDISSIAN, G., WU, C., RUCKOWSKI, M., HNATOWICH, D.J., The stability of ^{99m}Tc directly labeled to a Fab γ antibody via stannous ion and mercapto ethanol reduction, Nucl. Med. Comm. 13 (1992) 503-12.
33. HNATOWICH, D.J. VIRZI, F., FORGARASI, M., Can cysteine challenge assay predict the in vivo behavior of ^{99m}Tc labeled antibodies?, Nucl. Med. Biol. 21 (1994) 1035-44.
34. SVOBODA K., Survey of solvent extraction ^{99m}Tc -generator Technologies Radiochemical Acta 41 (1987) 83.

35. JUKKA, V. HILTUNEN., Search for new and improved radiolabeling methods for monoclonal antibodies. *Acta Oncológica* Vol. 32, N°7/8 (1993) 831 – 839..
36. THAKUR, M.L., DEFULVIO, J.D., ^{99m}Tc labeled monoclonal antibodies for immunoscintigraphy, *J. Immunol. Methods* 237 (1991) 217-24.
37. CASTRO, D., RAMÍREZ, N., Desarrollo de un agente de radiodiagnóstico con anticuerpos monoclonales para marcación con Tc ^{99m} y su aplicación en inmunogammagrafia. Tesis de Pre-Grado, Facultad de Farmacia Y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú (1999).
38. PETZOLDT, I., CABALLERO, J., ROBLES, A., AGURTO, G., Experiencia peruana en la producción de un kit liofilizado de IgG marcado con Tc ^{99m} (MEC). Informe Científico tecnológico, ISSN1684-1662, Instituto Peruano de Energía Nuclear, Lima – Perú, (2002).
39. CRUDO J. DURÁN A., ASURMENDI S., CASTIGLIA S.G., Producción de un kit de inmunoglobulina humana (IgG) para marcar con Tc ^{99m} (generador de adsorción). XXII Reunión Anual de la AATN. Buenos Aires – Argentina, (1994).
40. ECKELMAN, W.C., STEIGMAN, J., Direct Labelling with ^{99m}Tc, *Nucl. Med. Biol.* Vol.18 N°1 (1991) 3-7.
41. PETZOLDT, I., Parámetros de temperatura en el proceso de liofilización de los agentes para uso radiodiagnóstico y su influencia en la calidad del producto final. XVI Congreso de la Asociación Latinoamericana de Sociedades de Biología y Medicina Nuclear – 1999. Informe Científico Tecnológico - Instituto Peruano de Energía Nuclear, Lima – Perú, (1998-2001).

42. PETZOLDT, I., Formulación y evaluación de un kit liofilizado de macroagregado de albúmina, marcado con Tc 99m, para centellografía pulmonar. Informe Científico Tecnológico, ISSN 1684-1662. Instituto Peruano de Energía Nuclear, Lima – Peru, (2003).
43. ECKELMAN, W.C.; Development of radiochemically pure antibodies, Cancer Rev.50 (1990) 7805-25.
44. GOVERIC, P.D., Immunochemistry of hybridomas. IN: Srivastava, S., editor. Radiolabeled monoclonal antibodies for imaging and therapy, New York: Plenum Press, (1988) 3 -21.
45. KOGA, R.C., Obtención y purificación del anticuerpo monoclonal IOR-CEA1 marcado con el I 131, para el diagnostico precoz de enfermedades neoplásicas relacionadas con el adenocarcinoma embrionario. Tesis de Maestría , Unidad Post-Grado de la Universidad Nacional Federico Villarreal, Lima – Perú, (2004)
46. RAMOS, B., ROBLES, A., Optimización del ensayo de inmunoreactividad por el método de cromatografía de afinidad en capa fina para anticuerpos monoclonales marcados con tecnecio 99m, ISSN 1684-1662, Informe Científico Tecnológico, Instituto Peruano de Energía Nuclear, Lima – Perú, (2003).
47. RHODES, B.A., ZAMORA, P.A., et al, Tc 99m labeling of murine monoclonal antibody fragments. J. Nucl. Med. 27 (1986) 685-93.